

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Humberto Fenner Lyra Júnior

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
CÉLULAS RETAIS PRODUTORAS DE GRELINA EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas

Orientador:

Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Co-orientador:

Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da Universidade Federal
de Santa Catarina

Lyra Júnior, Humberto Fenner

Avaliação da expressão imuno-histoquímica das células
retais produtoras de grelina em ratos Wistar submetidos à
dieta de cafeteria [dissertação] / Humberto Fenner Lyra
Júnior ; orientador, Armando José d'Acampora ; co-
orientador, Leonardo de Lucca Schiavon. - Florianópolis,
SC, 2012.

94 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Grelina. 3. Dieta de cafeteria.
4. Imuno-histoquímica. 5. Obesidade. I. d'Acampora, Armando
José. II. Schiavon, Leonardo de Lucca. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas. IV. Título.

Humberto Fenner Lyra Júnior

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
CÉLULAS RETAIS PRODUTORAS DE GRELINA EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do grau de
“Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Florianópolis, 14 de dezembro de 2012.

Prof.^a Dr.^a Tânia Silvia Fröde

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Armando José d’Acampora,
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Murillo Ronald Capella,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Mauro dos Santos,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gilberto do Nascimento Galego,
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus companheiros de viagem:
Daniele Marquardt, Guilherme Lyra e
Julia Lyra que fazem valer a pena todo
tipo de sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Humberto e Maria Antonieta, pelo amor e apoio incondicional em todas as etapas e decisões da minha vida.

Aos professores, colegas e amigos do Serviço de Coloproctologia do HU – UFSC pelo apoio e incentivo.

Aos profissionais que participaram diretamente deste projeto e o tornaram realidade: Prof. Dr. Armando José d'Acampora, Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon, Prof^a. Daniella Serafin Couto Vieira, Prof. Marcelo Bianchini Teive, Residente André Muller Teive, Bioquímica Aline Costa, técnico Maico Oliveira Buss e acadêmica Angélica Luciana Nau.

Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

(Leonardo Da Vinci 1452-1519)

RESUMO

Introdução: Na atualidade o sobrepeso e a obesidade, induzidos pela dieta e pelo sedentarismo, são doenças muito prevalentes em vários países. Considerados uma epidemia mundial pela Organização Mundial da Saúde (OMS), são importantes fatores de risco para inúmeras afecções, entre elas as neoplasias colorretais. Estudos prévios sugerem que em portadores de obesidade ou sobrepeso há aumento da incidência desse tipo de neoplasia e a piora do prognóstico. Com a descoberta da grelina, em 1999, que é um hormônio orexígeno com potente ação sobre a liberação do hormônio do crescimento (GH) e atuação em diversos sistemas orgânicos, fisiológicos e na carcinogênese, desenvolveram-se diversas pesquisas para elucidar o seu papel e sua importância em todas essas funções. Recentemente, evidenciou-se aumento da expressão de grelina em amostras teciduais de neoplasias colorretais quando comparadas à tecidos colônicos normais. **Objetivos:** Investigar o impacto da dieta de cafeteria na expressão imuno-histoquímica retal da grelina e avaliar o tipo morfológico das células identificadas. **Desenho do Estudo:** Estudo analítico experimental do tipo corte transversal com intervenção. **Método:** Vinte e quatro ratos Wistar machos foram distribuídos em 4 subgrupos de 6 animais cada denominados: SGR1 (ração e água) e SGC1 (dieta de cafeteria, ração e água) por um período de 30 dias; SGR2 (ração e água) e SGC2 (dieta de cafeteria, ração e água) por um período de 60 dias. O peso dos animais e do reto amputado, o número e o tipo de células imunorreativas à grelina foram registrados e comparados entre os subgrupos. Na análise estatística foram utilizados os testes ANOVA com correção de Bonferroni, qui quadrado, teste t pareado e teste t de Student. **Resultados:** Houve aumento significativo do peso corporal em todos os subgrupos ($P=0,001$). O peso no dia da cirurgia foi significativamente maior na comparação do SGC2 com os demais subgrupos: SGR1 ($P=0,003$), SGC1 ($P=0,010$) e SGR2 ($P=0,001$).

Não houve diferença na comparação da média do número absoluto de células imunorreativas ($P=0,685$) e na comparação entre expressão e não expressão ($P=0,330$) entre os subgrupos, nem entre o peso final ($P=0,993$) e o peso retal ($P=0,230$) com a imunoexpressão. Todas as células imunorreativas identificadas foram do tipo “fechado”.

Conclusão: Os resultados do presente estudo não demonstraram influência da dieta de cafeteria sobre o número de células retais imunorreativas à grelina quando comparado aos controles nem aos dois períodos de ingesta e apenas células imunorreadoras do tipo “fechado” foram identificadas no reto de ratos Wistar.

Palavras-chave: Grelina; Obesidade; Câncer Colorretal; Dieta de Cafeteria; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Obesity and overweight induced by diet and lifestyle are considered a global epidemic by the World Health Organization (WHO), especially in western countries. They are important risk factors for several conditions, including colorectal cancer. Obese and overweight patients have already demonstrated an increased incidence and worse prognosis associated with colorectal cancer. Since discovery of ghrelin in 1999, which is a potent orexigenic hormone and releaser of the growth hormone (GH) that has many physiologic functions, several studies began to elucidate its role and importance in several areas including carcinogenesis. Recently it was demonstrated an increase on tissue ghrelin expression in colorectal cancers samples. **Objectives:** To investigate the impact of cafeteria diet on ghrelin expression in rectal tissue and identify the morphologic cell type. **Study Design:** Analytical and experimental transversal study with intervention. **Methods:** Twenty-four male Wistar rats were divided into 4 subgroups of 6 animals each: RCG1 (rat chow and water) and CAFG1 (cafeteria diet, rat chow and water) for a period of 30 days; RCG2 (rat chow and water) and CAFG2 (cafeteria diet, rat chow and water) for a period of 60 days. The animal and rectal weight, the number and the type of immunoreactive ghrelin cells were recorded and compared between the subgroups. ANOVA with Bonferroni correction, chi square, t student and paired t tests were applied. **Results:** There was a significant increase in body weight in all subgroups ($P=0,001$). The weight on the operation day was significantly higher in the CAFG2 in comparison with others subgroups: RCG1 ($P=0,003$), CAFG1 ($P=0,010$) and RCG2 ($P=0,001$). There was no difference in the total of immunoreactive cells ($P=0,685$), presence or absence of ghrelin expression between the subgroups ($P=0,330$), nor in the final weight ($P=0,993$) and rectal weight ($P=0,230$) in comparison with immunoreexpression. All the immunoreactive cells identified were closed-type. **Conclusion:** The present study showed no influence of cafeteria diet on the amount of immunoreactive rectal cells of ghrelin when compared to controls and

with two periods of exposure. Only one type (closed-type) of immunoreactive cells was expressed in the rectum.

Keywords: Ghrelin; Obesity; Colorrectal Cancer; Cafeteria Diet; Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organograma da divisão da amostra em subgrupos.	49
Figura 2	Esquema mostrando o período de alimentação (dias) de cada subgrupo.....	50
Figura 3	Fotografia da marcação da sonda retal.....	53
Figura 4	Fotografia da cateterização retal com a sonda.....	53
Figura 5	Fotografia da dissecação pélvica e isolamento do reto.....	54
Figura 6	Fotografia do reto amputado.....	54
Figura 7	Desenho esquemático da tatuagem do reto.....	55
Figura 8	Fotografia do reto tatuado com nanquim.....	56
Figura 9	Desenho esquemático demonstrando o corte longitudinal realizado na parede retal anterior para emblocamento em parafina.....	57
Figura 10	Fotografia do reto tatuado e emblocado em parafina.....	58
Figura 11	Desenho esquemático demonstrando o método imuno-histoquímico estreptoavidina / biotina.....	60
Figura 12	Fotografias das lâminas com células imunorreativas à grelina.....	61
Figura 13	Gráfico da evolução das médias de peso corporal (gramas) durante o período de dieta, desde o início do estudo até o dia da cirurgia nos subgrupos Cafeteria 1 e Ração 1.....	63
Figura 14	Gráfico da evolução das médias de peso corporal (gramas) durante o período de dieta, desde o início do estudo até o dia da cirurgia nos subgrupos Cafeteria 2 e Ração 2.....	64
Figura 15	Gráfico da média de peso corporal em gramas no dia da cirurgia em todos os subgrupos.....	65
Figura 16	Gráfico da variação média do ganho de peso corporal em gramas (do início da dieta ao dia da cirurgia) em todos os subgrupos.....	66
Figura 17	Gráfico da média do peso retal em gramas em todos os subgrupos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvio padrão (DP) do peso corporal em gramas no dia da cirurgia para os diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2).....	64
Tabela 2	Variação do ganho de peso corporal em gramas (do início da dieta ao dia da cirurgia) e desvio padrão (DP) dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2).....	65
Tabela 3	Média e desvio padrão (DP) do peso retal em gramas dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2).....	67
Tabela 4	Média do número de células retais imunorreativas à grelina e desvio padrão (DP) dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2).....	68
Tabela 5	Média e desvio padrão (DP) do peso do animal na cirurgia e do peso retal em gramas comparados à expressão ou não de células de grelina.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ⁺²]	Concentração Intra-Celular de Cálcio
AKT	Proteína Quinase B
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclica
Arg	Arginina
CAFG1	Cafeteria Group 1
CAFG2	Cafeteria Group 2
CCR	Câncer Colorretal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Cromógeno Diaminobenzidina 3,3'
DC	Dieta de Cafeteria
DP	Desvio Padrão
EUA	Estados Unidos da América
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHRH-R	Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHS	Secretagogo do Hormônio do Crescimento
GHS-R	Receptor do Secretagogo do Hormônio do Crescimento
Gln	Glutamina
GOAT	Grelina O Acetil Transferase
HE	Hematoxilina - Eosina
HU	Hospital Universitário
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
MAPK	Proteína Quinase Mitogênica Ativada
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina de Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD1	Células Gástricas Endócrinas Produtoras de Grelina em Humanos
PPAR-γ2	Receptor Proliferador Ativado do Peroxissoma Gama 2
RCG1	Rat Chow Group 1
RCG2	Rat Chow Group 2
RNA	Ácido Ribonucleico
SAP	Serviço de Anatomia Patológica
Ser	Serina
SGC1	Subgrupo Cafeteria 1

SGC2	Subgrupo Cafeteria 2
SGR1	Subgrupo Ração 1
SGR2	Subgrupo Ração 2
SRIF-R	Receptor do Fator Inibidor da Liberação de Somatostatina
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOCE	Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Val	Valina
WHO	World Health Organization
X/A like	Células Gástricas Endócrinas Produtoras de Grelina em Ratos

SUMÁRIO

I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. Considerações Gerais.....	29
1.2. Grelina.....	31
1.2.1. Identificação e Estrutura.....	31
1.2.2. Distribuição da Grelina.....	35
1.2.3. Características Fisiológicas.....	36
1.2.4. Tipos de Receptores.....	37
1.2.5. Grelina e Câncer.....	38
1.2.6. Grelina no Câncer Gastrointestinal e Colorretal.....	39
1.3. Obesidade e Câncer Colorretal.....	40
1.4. Dieta de Cafeteria.....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	44
II. OBJETIVOS.....	45
1. Objetivo Geral.....	45
2. Objetivos Específicos.....	45
III. MÉTODO.....	47
1. Delineamento do Estudo.....	47
2. Amostra.....	47
3. Aspectos Éticos.....	50
4. Intervenções.....	50
4.1. Dieta de Cafeteria.....	50
4.2. Dieta Balanceada (Ração).....	51
4.3. Procedimento Anestésico.....	51
4.4. Procedimento Cirúrgico (Amputação do Reto).....	51
4.5. Morte Indolor Assistida.....	55
5. Preparação para o Estudo Imuno-histoquímico.....	55
5.1. Etapas da Preparação Macroscópica e Processamento Histológico.....	55
5.2. Método Imunohistoquímico de Contagem Celular.....	58
6. Análise Estatística.....	61
IV. RESULTADOS.....	63
V. DISCUSSÃO.....	71
VI. CONCLUSÕES.....	79
VII. REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A – Protocolo de aprovação do departamento de cirurgia HU-UFSC.....	93
ANEXO B – Protocolo de aprovação da CEUA – UFSC.....	94

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Atualmente, a obesidade e o sobrepeso são uma epidemia e, como tal, um problema de saúde pública mundial, com suas prevalências aumentando constantemente tanto nos países desenvolvidos(1-4) quanto naqueles em desenvolvimento(5-6).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para o aumento do número de obesos, e relata que a obesidade no mundo duplicou desde 1980. A classificação utilizada para graduação da doença tem como base o índice de massa corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso em quilogramas pela altura em metros elevada ao quadrado. IMC maior que 25 significa sobrepeso, e IMC maior que 30, obesidade(7).

Em 2008, 1,5 bilhão de adultos estava com sobrepeso, e um terço deles era obeso. Entre as crianças até o 5º ano de vida, 43 milhões encontravam-se com sobrepeso em 2010. A OMS estima que, em 2015, haverá mais de 700 milhões de pessoas com IMC acima de 30(7-8).

As principais causas de obesidade são definidas pela OMS como: aumento da ingestão de alimentos com alta densidade energética, sal e açúcares, e com poucas vitaminas e minerais; e aumento do sedentarismo nas atividades laborais e de lazer, devido principalmente à urbanização e aos avanços tecnológicos(7).

Nos últimos 40 anos, a prevalência de obesidade ($IMC > 30$) nos Estados Unidos da América (EUA) cresceu de 13% para 30% e, atualmente, cerca de dois terços da população têm IMC maior que 25 (3, 9). Um estudo populacional recente demonstrou que o percentual de obesidade ($IMC > 30$), manteve-se estável em 35% na última década nos EUA(10). Dados europeus também confirmam valores de proporções epidêmicas nesse continente, onde 28% dos homens e 36% das mulheres são obesos, com estimativa de aumento dos valores até 2015(11-12).

Apesar de o Brasil não possuir taxas tão elevadas de obesidade e sobrepeso, como às dos EUA, a tendência de aumento dessa doença também é notada por aqui. Um estudo populacional realizado em

adultos evidenciou aumento no percentual de obesos de 10,8% em 2006 para 13,5% em 2009(5). Nota-se que a maior prevalência de obesidade e sobrepeso é registrada nas regiões mais desenvolvidas e nas classes sociais mais altas(13-14).

Um importante estudo prospectivo de coorte realizado durante 16 anos nos EUA, que acompanhou uma população com mais de 900.000 indivíduos, constatou que o sobrepeso e a obesidade foram importantes fatores de risco para morte em pacientes com todo tipo de neoplasia e estimou que cerca de 90.000 mortes por câncer, tanto em homens quanto em mulheres, poderiam ser evitadas a cada ano caso esses indivíduos se mantivessem no peso normal(15).

A obesidade é identificada como um importante fator de risco para o câncer colorretal (CCR) em vários trabalhos publicados na literatura mundial, os quais apontam para um aumento de até duas vezes o risco entre os obesos quando comparados aos não-obesos (16-20). Entre os sexos há algumas diferenças nessa influência, sendo maior entre homens e entre mulheres na pré-menopausa, e não significativa naquelas na pós-menopausa(17).

Excluindo-se os cânceres de pele, essa é a terceira neoplasia mais prevalente nos EUA, sendo a segunda causa de morte por câncer naquele país(21). No Brasil também ocupa essa mesma posição em relação às outras neoplasias, onde, para 2012, estimam-se 30.140 novos casos(22).

Uma meta-análise realizada em 2007 com 31 estudos prospectivos relacionando IMC e CCR encontrou forte associação entre obesidade e câncer colônico em ambos os sexos e associação com câncer retal em homens. Esse mesmo trabalho sugeriu envolvimento de fatores hormonais na gênese neoplásica, como insulina, fatores de crescimento *insulina like*, leptina e adiponectina, resultado que ainda necessita de mais investigações(23). Outra meta-análise, realizada no mesmo ano, que envolveu estudos de coorte, também encontrou um risco relativo aumentado para desenvolvimento de CCR em homens com sobrepeso e obesos, não sendo significativo nas mulheres(24). Apesar desses resultados, maiores investigações são necessárias para

esclarecimento do mecanismo fisiopatológico detalhado da participação da obesidade na carcinogênese colorretal.

Um novo campo de pesquisa na área da oncogênese abriu-se com a descoberta da grelina(25), devido à sua influência nos fatores de crescimento celular, controle hormonal e regulação da fome, fato esse que está ligado diretamente ao ganho ponderal e à obesidade.

Em 2004, Freeman publicou um capítulo sobre a possível influência hormonal na patogênese de cânceres esofágicos e intestinais. Leptina e grelina foram citadas como substâncias que poderiam atuar na carcinogênese dessas neoplasias, e que drogas usadas para emagrecimento teriam papel na indução do câncer(26).

A expressão de receptores de grelina em neoplasias esofágicas, colorretais, gástricas e hepáticas foi demonstrada pela primeira vez por Wang et al. em 2007 (27), os quais sugeriram uma relação entre o nível de expressão e os fatores prognósticos, porém com a necessidade de mais pesquisas para esclarecer o verdadeiro valor dessa descoberta. Também em 2008, demonstrou-se, em tecidos de neoplasias colorretais humanas, maior expressão de um subtipo de receptor de grelina em pacientes obesos, o que reforçou o papel desse peptídeo na carcinogênese colorretal(28).

1.2 Grelina

1.2.1 Identificação e Estrutura

A grelina é um hormônio que foi isolado no estômago de ratos e identificado por Kojima et al. em 1999(25), a qual apresenta várias ações sobre diversos sistemas orgânicos, estimulando a liberação do hormônio de crescimento (*growth hormone*, GH) (29). Sua denominação deriva da fusão de uma raiz protoindu-européia (*ghre*), que significa crescimento, com a palavra inglesa *release*, cujo significado é liberação.

O hormônio do crescimento (GH) é secretado de maneira pulsátil na região anterior da glândula pituitária (adeno-hipófise), de forma a atuar no crescimento e diferenciação celular, no metabolismo dos carboidratos, lipídios, proteínas, e também no balanço hidroeletrólítico(30).

Até a descoberta da grelina, em 1999, as vias estimulatórias de liberação do GH pelos somatotrofos localizados na adeno-hipófise eram sabidamente mediadas por dois tipos de hormônios:

1. hormônio liberador do GH (GHRH): ligando-se a receptores denominados de GHRH-R e levando a um aumento nos níveis de AMPc (31-32); e
2. secretagogos do GH (GHS): substâncias derivadas de opióides, sintetizadas em laboratório a partir de 1984(32-35), ligando-se a receptores denominados de GHS-R, que foram identificados por Howard et al. em 1996(36), que promovem aumento dos níveis intracelulares de cálcio $[Ca^{2+}]_i$.

Os GHS-R ficaram conhecidos então como “receptores órfãos”, pois possuíam apenas ligantes sintéticos sem um ligante endógeno caracterizado, até a purificação da grelina por Kojima et al.(25, 37).

A via inibitória da liberação do GH na adeno-hipófise é mediada pela somatostatina, que atua sobre vários subtipos de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana, conhecidos como receptores dos fatores inibidores da liberação de somatostatina (SRIF-R), promovendo a diminuição da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ e da atividade da adenilciclase(38).

Pesquisas experimentais em ratos que utilizaram a estratégia do “receptor órfão” nos tecidos que sabidamente possuíam os GHS-R, como cérebro, hipófise e pâncreas, foram realizadas objetivando a identificação desse ligante natural endógeno, porém sem sucesso(39-40). Entretanto, em 1999, Kojima et al., testando extratos de culturas teciduais de diversos órgãos de ratos como cérebro, pulmões, rins, estômago e intestino, em células que sabidamente expressavam esses GHS-Rs, mensuraram as mudanças na concentração intracelular de cálcio nessas células e encontraram uma maior atividade naqueles extratos derivados do estômago, conseguindo assim purificar e identificar a grelina após quatro etapas de cromatografia(25).

Trata-se de um peptídeo com estrutura composta de 28 aminoácidos e uma modificação na posição serina³ induzida por um ácido n-octanoide. É o único caso conhecido de hormônio peptídeo modificado e ativado por ácido graxo que estimula a secreção de GH pela hipófise tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Também se verificou a mesma modificação na posição serina³ na forma humana da grelina, que é homóloga à de ratos, excetuando pela troca de dois aminoácidos (arg¹¹ – val¹²)(25).

A produção desse peptídeo foi bem definida por estudos em humanos, ratos e outros mamíferos, e é realizada predominantemente no estômago nas células enteroendócrinas PD1 (humanos) e *X/A-like* (ratos) situadas na mucosa oxíntica desse órgão(41-43). Hayashida et al., utilizando método imuno-histoquímico, encontraram células produtoras de grelina no estômago fetal de ratos com 18 dias de gestação, o que sugere uma atuação no desenvolvimento neonatal(44). Sakata et al. demonstraram que a densidade de células produtoras de grelina no estômago de ratos aumenta após o nascimento, sendo levemente maior nas fêmeas do que nos machos(45), fato que também é notado quando se compararam os níveis plasmáticos do peptídeo entre humanos de ambos os sexos(46).

Um segundo ligante endógeno para os GHS-Rs foi também purificado no estômago de ratos por Hosoda et al., em 2000, com as mesmas características estruturais da grelina, salvo deleção de uma glutamina (gln¹⁴). Esse peptídeo mantém a mesma propriedade de estimular a secreção GH e ficou conhecido como *Rat des-Gln¹⁴-Ghrelin*, por ser uma forma derivada da grelina já descrita(47).

Em 2003 Hosoda et al. utilizaram extratos teciduais de estômagos humanos e, com técnicas de radioimunoensaio grelina-específicas, isolaram diferentes formas de peptídeos derivados da molécula precursora da grelina. Classificaram-nas em quatro grupos distintos, de acordo com a acetilação na posição ser³, em: não- acetilados, octanoacetilados (C8:0), decanoacetilados (C10:0) e decenoacetilados (C10:1); e em dois grupos, de acordo com o número de aminoácidos da molécula: 27 e 28. Todas essas formas foram encontradas tanto no plasma quanto no estômago humano, numa proporção de 3:1 em favor

daquela formada pela cadeia de 28 aminoácidos. A forma mais ativa do hormônio continuou sendo a composta de 28 aminoácidos e com a modificação n-octano na posição ser³(48).

A enzima que é responsável pela acetilação da grelina foi identificada em 2008 e trata-se de uma enzima *porcupine-like* pertencente à superfamília das O-aciltransferases ligantes de membrana, e ficou denominada *Ghrelin O-acyltransferase* (GOAT)(49). Sua expressão foi detectada em inúmeros tecidos através de métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e transcrição reversa, reforçando o conceito de sua ação parácrina local(50-51).

As duas principais e mais abundantes moléculas de grelina, encontradas tanto no plasma quanto em vários tecidos de ratos através de técnicas de radioimunoensaio, são a forma acetilada n-octano, já citada anteriormente, e a não- acetilada, denominada *des-acyl- grelina*. A forma não- acetilada não produz ativação dos GHS-Rs, e até o momento não há definição sobre suas propriedades farmacológicas. O que se sabe é que a modificação na posição ser³ é indispensável para sua função(52).

O principal fator regulatório da secreção da grelina é a alimentação. Demonstrou-se por técnicas de radioimunoensaio que os níveis plasmáticos aumentam em até duas vezes imediatamente antes das refeições e caem bruscamente após a primeira hora pós-prandial(53). Os níveis glicêmicos também afetam diretamente a concentração sérica de grelina, que diminui após a administração oral ou venosa de glicose(54).

Alterações nas concentrações plasmáticas de grelina são notadas ainda em distúrbios psiquiátricos como anorexia nervosa e bulimia, quando os níveis estão aumentados(55-56), e em pacientes com intestino curto ou naqueles que utilizam anorexígenos orais, quando há supressão da concentração sérica de grelina(57). A distensão gástrica mecânica por si só não alterou a concentração de grelina circulante em ratos, mas a ingestão de alimentos com alto teor de gorduras está relacionada a níveis reduzidos do hormônio(58).

De forma geral a concentração plasmática da grelina é maior em pessoas magras quando comparado às obesas(59-60) e também é

influenciada pelo ritmo circadiano, aumentando durante a noite e retornando a níveis basais pela manhã(61).

1.2.2 Distribuição da Grelina

A maior fonte produtora de grelina sérica é o trato gastrointestinal (TGI), sendo o estômago o maior produtor, seguido do intestino delgado(62). Utilizando-se métodos imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ*, células produtoras de grelina foram identificadas na camada mucosa do corpo gástrico, duodeno, íleo, ceco e cólon, em diferentes níveis de expressão(63-64). Também se encontraram dois tipos morfológicamente distintos de células, “abertas” e “fechadas”, sem diferenças imunorreativas, mas com distribuição diferente ao longo dos segmentos, diminuindo drasticamente a densidade das do tipo “fechadas” à medida que se progride em direção distal do TGI(65). No estômago, há apenas células do tipo fechado, enquanto nos demais segmentos existem os dois tipos(65).

Acredita-se que as células do tipo aberto são reguladas por informações intraluminais, como nutrientes e pH, e as do tipo fechado, por estimulação neuronal, hormonal ou distensão mecânica. Também não há consenso na literatura se são as mesmas células em estágios diferentes de desenvolvimento ou se realmente são dois tipos morfofisiológicos distintos(66).

Estudos realizados em humanos e ratos submetidos a gastrectomia mostraram diminuição de 65% dos níveis plasmáticos do hormônio naqueles humanos gastrectomizados(62), e de 80% entre os ratos(43), confirmando a hipótese de que o estômago é a maior fonte produtora de grelina circulante. Em estudo experimental recentemente realizado em nosso meio, a técnica de *sleeve*, que é na atualidade largamente utilizada para cirurgia da obesidade mórbida em humanos, também não promoveu aumento compensatório da expressão das células de grelina no duodeno(67).

Ainda, em humanos e ratos, células produtoras de grelina foram encontradas nas células α - periféricas das ilhotas pancreáticas, atuando também no mecanismo de liberação de insulina(68).

Outros tecidos também possuem células produtoras de grelina e GHS-Rs em diferentes quantidades, como cérebro, rins, placenta e células germinativas, entre outros(40, 63), sugerindo grande abrangência de atuação dessa substância.

Recentemente demonstrou-se a existência de células produtoras de grelina no epitélio glandular do cólon e reto de ratos Wistar com 60 dias de vida. Também foram isoladas, no mesmo estudo, as formas não-acetiladas e acetiladas do hormônio nesses tecidos, com predominância da primeira em relação à segunda(69). Em humanos, também se detectaram receptores e células produtoras de grelina em colonócitos normais e neoplásicos, confirmando sua existência nesses segmentos do TGI(28).

1.2.3 Características Fisiológicas

A grelina é um hormônio com várias funções fisiológicas, entre as quais a principal é a liberação da secreção de GH, sendo esse estímulo duas a três vezes mais forte e efetivo que o produzido pelo GHRH(25).

Ela é o único peptídeo orexígeno bem definido até o momento que atua diretamente sobre o hipotálamo em neurônios no núcleo arqueado, estimulando o apetite e a ingestão alimentar. Em 2000, Nakazato et al. demonstraram que injeções intracerebroventriculares de grelina aumentaram a ingestão alimentar e o ganho ponderal em ratos(70-71). A administração periférica desse peptídeo também exerce efeitos sobre neurônios hipotalâmicos ao nível central, ao contrário do que ocorre com outros peptídeos administrados pela mesma via. Isso ocorre devido à transmissão via nervo vago, onde também foram encontrados receptores de grelina(72-73).

Suas outras ações abrangem o sistema cardiovascular, aumentando o débito cardíaco e diminuindo a pressão arterial(74-75), e o sistema endócrino, atuando sobre o pâncreas, aumentando a glicemia, muito embora haja discordâncias entre vários pesquisadores com relação à regulação de secreção insulínica, tanto em modelos animais quanto em humanos, a ponto de serem necessárias pesquisas futuras(68, 76-78).

Efeitos sobre a motilidade gástrica já são definidos como o aumento da secreção ácida, do esvaziamento gástrico e do *turnover* das células na mucosa(72, 79-80).

Também foram isolados e identificados com imuno-histoquímica e PCR a grelina e seus receptores (GHS-Rs) tipo 1a nos osteoblastos de ratos, ocorrendo aumento na diferenciação desses osteoblastos e da densidade mineral óssea após estimulação com o hormônio(81).

Estudo populacional recente em crianças obesas e não- obesas mostrou diferenças nos níveis das duas formas da grelina entre os grupos quando comparados à pré- puberdade e puberdade, o que fortemente sugere atuação nas funções metabólicas durante o desenvolvimento infantil(82).

Recentemente, também se evidenciou grelina e seus receptores em neutrófilos, linfócitos e macrófagos, sugerindo envolvimento na imunomodulação(83). Trabalhos experimentais conseguiram demonstrar efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos da grelina mediante a modulação na secreção de citocinas, que atuam na cascata da inflamação, estimulando uma nova linha de pesquisa para tratamento de doenças autoimunes, respiratórias, hepáticas e inflamatórias intestinais(84-88).

Todas essas ações e efeitos abrem um grande horizonte para aplicação clínica e prática da grelina sobre doenças gastrointestinais, cardiovasculares, osteoporose, distúrbios alimentares, do crescimento, envelhecimento e estados consumptivos, entre outros.

1.2.4 Tipos de Receptores

Os receptores de grelina (GHS-R) pertencem à superfamília dos receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G e são divididos em dois tipos principais, denominados GHS-R 1a e GHS-R 1b(36). O tipo 1a é ativo e responsável pelas funções biológicas, enquanto o 1b não tem efeitos comprovados ainda. Vários estudos já demonstraram a expressão do RNA mensageiro desses receptores em inúmeros tecidos como sistema nervoso central, trato gastrointestinal, rins, mama, coração, pulmões, tireoide, próstata, sistema imune,

músculos, tecido adiposo, entre outros, sugerindo atuação diversificada em muitas funções orgânicas(63, 89).

1.2.5 Grelina e Câncer

Atualmente, existe forte evidência na literatura mundial de que a grelina por meio de mecanismos autócrinos ou parácrinos, atua em processos relacionados às etapas da progressão do câncer, como proliferação, migração e invasão celular, e apoptose(90-92).

Em tumores hormônio-dependentes, como os prostáticos, foi demonstrado que a grelina estimula o crescimento das células cancerosas *in vitro*, ativando a via da enzima proteína quinase mitogênica ativada (MAPK). Também foi evidenciada maior expressão das formas acetiladas e não- acetiladas nos tecidos tumorais quando comparados aos tecidos prostáticos normais(93). Na mama, esse comportamento *in vitro* também ocorre e, curiosamente, há uma expressão muito mais elevada da forma não- acetilada e dos receptores GHS-R tipo 1b nos tecidos neoplásicos mamários, sugerindo que eles possam servir como fatores diagnósticos ou prognósticos futuros e até mesmo alvo para bloqueios medicamentosos(94). Da mesma forma, no câncer endometrial, há aumento demonstrado da proliferação celular *in vitro*, e o grau de diferenciação celular tumoral está relacionado com os níveis de expressão tissular da grelina e seus receptores(91).

Apesar dessas evidências, ainda há controvérsias sobre o papel da grelina na estimulação do crescimento tumoral, pois em certos tipos de linhagem tumoral, tratados com esse peptídeo, como tumores foliculares de tireoide, carcinomas epidermóides e de pequenas células pulmonares, a proliferação celular não é afetada e até mesmo inibida, como no caso dos primeiros(95-97).

A migração e a invasão celulares são outras etapas da carcinogênese que também sofrem interferência desse hormônio, como foi demonstrado em alguns tipos de cânceres do sistema nervoso central(98) e pancreático(99), havendo em determinados casos, como nos astrocitomas, uma mediação dose- dependente(98). O incremento dessas ações dá-se pela interferência da grelina na via da Fosfoinositol-

3-quinase/AKT, responsável pelo aumento da mobilidade e invasão celular(99).

Atualmente, poucos estudos têm investigado a relação entre grelina e apoptose no câncer. Estes apresentam resultados conflitantes com relação a seus efeitos apoptóticos e antiapoptóticos. No câncer endometrial, Fung et al. demonstraram efeito protetor em células tratadas com agente indutor de apoptose(91); já em tumores pulmonares de pequenas células e prostáticos foi demonstrada ação pró-apoptótica(97, 100).

Especificamente no CCR, demonstrou-se por He et al., em 2011, que células humanas tumorais tratadas com grelina exibiram resistência à apoptose induzida pelo 5-fluoracil (quimioterápico largamente utilizado na terapia neoadjuvante e adjuvante desse tipo de tumor), quando comparadas àquelas não expostas à solução desse peptídeo *in vitro*, sugerindo um importante papel na quimiorresistência e sensibilidade a essa droga nesses casos(101).

1.2.6 Grelina no Câncer Gastrointestinal e Colorretal

A expressão e a distribuição de GHS-Rs e grelina em cânceres do TGI foram demonstradas pela primeira vez em 2007 por Wang et al.(27),que, utilizando técnicas de microarranjo (*microarray*) e imunohistoquímica, identificaram essas substâncias nas amostras de tecidos neoplásicos humanos em diferentes sítios, como esôfago, cólon, reto e fígado. O principal local de expressão foi o citoplasma das células epiteliais. Tumores esofágicos e gástricos apresentaram maior expressão do que os colorretais e hepáticos. Em todos os casos, a expressão foi maior nos tecidos neoplásicos quando comparados aos tecidos normais do mesmo segmento(27).

Da mesma maneira, ainda em 2007(102), Huang et al. demonstraram que os níveis plasmáticos de grelina circulante não aumentavam significativamente em pacientes caquéticos portadores de tumores gástricos e colorretais, resultado que não era similar aos encontrados na caquexia induzida por outras doenças ou em indivíduos saudáveis, sugerindo um possível efeito dessas neoplasias sobre o eixo

de produção desse hormônio e aventando a possibilidade de tratamentos que utilizassem grelina exógena nessas situações.

Níveis de grelina circulantes foram mensurados em pacientes saudáveis e em portadores de neoplasias colorretais, fazendo-se correlação com estágio tumoral, infecção por *Helicobacter pylori* e IMC. Os níveis do peptídeo foram menores entre os doentes quando comparados aos hígidos, porém não houve diferença significativa nas variáveis analisadas entre os grupos(103).

Waseem et al. conduziram um estudo com o objetivo de determinar o papel da produção endógena de grelina e da expressão de seus subtipos de receptores na progressão do CCR, comparando células malignas com células normais(28). Eles demonstraram por imuno-histoquímica que os tecidos malignos colorretais exibiram maior expressão de grelina de maneira estágio- dependente quando comparados aos controles. Da mesma forma, utilizaram técnicas de PCR e Western Blot para análise dos GHS-Rs e constataram uma drástica diminuição na expressão tecidual nos do tipo 1a e um significativo aumento nos do tipo 1b na comparação entre os grupos, sugerindo outra via de regulação na gênese desses tumores, não identificada até a atualidade.

Outro dado importante desse estudo foram os altos níveis plasmáticos de grelina encontrados nos pacientes obesos portadores de CCR (82%) quando comparados aos obesos saudáveis, sugerindo importância do eixo grelina/GHS-R no desenvolvimento do CCR em obesos(28).

1.3 Obesidade e Câncer Colorretal

Dados epidemiológicos das últimas décadas sugerem uma forte e crescente associação entre a obesidade e o CCR. Esses achados são mais evidentes em áreas onde há uma alta taxa de industrialização e, consequentemente, maior percentual de pessoas obesas, diferindo daqueles países com economia baseada em atividades não-industriais(104-105).

Dados obtidos de modelos experimentais animais também indicam que a diminuição da ingesta calórica influencia diretamente a

carcinogênese colorretal, diminuindo a proliferação celular colônica em ratos, o que sugere um efeito protetor no epitélio(106).

Uma meta- análise realizada em 2007, que avaliou 15 estudos de coorte realizados nos EUA, Austrália, Canadá, Japão, Áustria e Europa, relacionando IMC, circunferência abdominal e relação cintura-quadril com o risco de CCR, concluiu que os indivíduos obesos e com sobrepeso possuíam maior risco de desenvolver esse tipo de neoplasia. Esse achado foi mais significativo em homens: a média geral do risco relativo nesses estudos foi de 1,59 nos homens e 1,22 nas mulheres(24).

Ainda em 2007, outra meta- análise que analisou 31 estudos prospectivos realizados em um período de 41 anos também encontrou aumento do risco de câncer colônico para homens e mulheres diretamente proporcional ao IMC, à circunferência abdominal e à relação cintura-quadril. Com relação ao câncer retal, essa associação não apresentou significância estatística em indivíduos do sexo feminino(23).

Recentemente, um estudo de coorte prospectivo realizado na Noruega e publicado em 2010, que acompanhou 76.000 indivíduos de ambos os sexos por um período de 14 anos e que avaliou IMC e o risco de neoplasia colônica, constatou que um aumento no peso de 10 quilogramas em homens que já apresentavam sobrepeso resultou em maior risco para esse grupo (RR 2,09), não tendo a mesma significância entre as mulheres(107). No Japão, uma análise de oitos importantes estudos populacionais com mais de 300.000 indivíduos publicada em 2012 também concluiu que há uma alta associação entre o IMC e o CCR, principalmente nos homens, sendo mais significativa em neoplasias do cólon proximal(108).

Os mecanismos pelos quais a obesidade está relacionada ao CCR ainda não estão bem estabelecidos. Vários fatores têm sido estudados para tentar explicar a indução da formação desse tipo de câncer. Entre elas se destacam os fatores de crescimento, a resistência periférica à insulina e a inflamação crônica(109).

Foi demonstrado que pacientes diabéticos tipo 2 tem risco três vezes maior de desenvolver CCR do que os não- diabéticos. Tal fato deve-se à resistência aumentada à insulina e às altas concentrações circulantes dessa substância nesses indivíduos. Nesses casos, órgãos que

classicamente não seriam alvo, como o cólon, começam a expressar seus receptores e a sofrer efeitos que incluiriam aumento na proliferação celular local(110-112).

A obesidade é um estado de inflamação crônica induzido por altos níveis circulantes de glicose, grande produção e armazenamento de lipídios, o que cria um ambiente oxidativo pró-inflamatório, o qual, por sua vez, interfere em diversos níveis e sistemas orgânicos, promovendo alterações em seus receptores e citocinas(113-114). Para exemplificar, quando se compara o tecido adiposo de indivíduos magros e obesos, os últimos expressam maiores níveis de TNF- α , IL-6 e Proteína C reativa(115). Todas essas evidências levam a crer que esse estado inflamatório crônico promova a formação do câncer, assim como acontece sabidamente nas doenças intestinais inflamatórias. Entretanto, novos estudos são necessários com a finalidade de estabelecer-se o nexo causal e elucidar os mecanismos fisiopatológicos da carcinogênese colorretal secundária ao processo inflamatório crônico relacionado à obesidade.

1.4 Dieta de Cafeteria (DC)

É um modelo de dieta utilizado em pesquisas experimentais com ratos que induz a síndrome metabólica, o ganho de peso, as disfunções múltiplas de órgãos e as doenças causadas pela obesidade. Trata-se de uma dieta em que os animais tem acesso *ad libitum* a alimentos humanos com alta densidade energética e saborosos, como chocolates, *bacon*, bolachas recheadas, refrigerantes, entre outros, juntamente com água e ração(116).

Esse mesmo regime alimentar foi utilizado em nosso meio por Colombo et al., em estudo experimental com ratos Wistar alimentados por um período de 35 dias na pesquisa do efeito sobre resistência periférica à insulina e sobre níveis plasmáticos de adiponectina e grelina, onde houve significativo ganho de peso no grupo submetido à esse tipo de dieta quando comparado ao grupo controle(117).

Em outro estudo recente, que comparou a DC com diferentes estilos de dietas indutoras de obesidade em ratos Wistar, ela foi considerada o melhor método para reproduzir as tendências atuais da

obesidade humana(118). É uma dieta que reflete com maior veracidade a variação de alimentos palatáveis com alta densidade calórica existentes na sociedade ocidental e que estão associados à pandemia de obesidade da atualidade(118).

Esse tipo de dieta promove uma hiperfagia voluntária, que resulta em rápido ganho de peso e causa efeitos clínicos e histológicos que incluem esteatose e inflamação hepática, com aumento da infiltração de macrófagos perivascularres, hiperglicemia, aumento da resistência periférica à insulina pela disfunção nas ilhotas pancreáticas, aumento do tecido adiposo subcutâneo e visceral, e alteração na função cardíaca pelo depósito de colágeno nos miofilamentos miocárdicos(118-120).

Demonstrou-se por Rodriguez et al. que ratos Wistar submetidos a esse tipo de regime durante duas semanas já apresentaram alteração estatisticamente significativa nos depósitos de gordura branca e marrom, no peso corporal e no perfil lipídico plasmático(121).

Recentemente, com métodos imuno-histoquímicos e de radioimunoensaio, comparou-se a expressão tecidual (urogenital, pele, sistema cárdiorrespiratório, sistema imune, sistema nervoso central, etc.) e os níveis plasmáticos de grelina em ratos Wistar, sob o regime de DC e regime *standard* durante 12 semanas, quando se constatou diminuição tanto plasmática quanto tecidual no grupo alimentado com DC(122). No trato gastrointestinal também houve influência da dieta de cafeteria na expressão tecidual da grelina em ratos Wistar quando comparados aos controles, fortalecendo a hipótese da influência da alimentação sobre o eixo de produção desse hormônio(69).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser um dos tipos de neoplasias mais bem estudados e geneticamente definidos da atualidade, o CCR ainda se mantém como uma doença muito prevalente e com significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo. Esse tumor também influi de maneira importante nos orçamentos governamentais com gastos em terapia adjuvante, neoadjuvante, tratamentos cirúrgicos, internações hospitalares, esquemas de rastreamento e afastamento do trabalho. Sua incidência vem aumentando em todas as sociedades do globo juntamente com a obesidade e o sobrepeso, que se tornaram uma pandemia mundial e um grave problema de saúde pública.

A relação entre obesidade e CCR já foi demonstrada exaustivamente na literatura mundial, inclusive sendo ela fator de complicações pós-operatórias e de mau prognóstico. Essa associação pode ser relacionada ao sedentarismo, ao tipo de dieta e aos hábitos de vida da população, principalmente do mundo ocidental, que estão baseadas na ingestão de alimentos com grandes quantidades de gorduras e calorias.

Com a descoberta da grelina que é um hormônio orexígeno potente e atua principalmente na regulação da ingestão alimentar, vários trabalhos foram publicados demonstrando sua influência nos estados hiperfágicos, metabólicos e na caquexia induzida por câncer. Também se demonstrou influência ou algum tipo de expressão desse peptídeo relacionado à carcinogênese de vários tipos de câncer, entre eles o CCR.

Atualmente, especula-se que a grelina possa servir de marcador ou mesmo alvo para terapias futuras visando ao tratamento e ao controle dessas neoplasias. Apesar dos avanços recentes, poucos autores dedicaram-se a investigar a relação entre a obesidade induzida pela dieta e a expressão colorretal de grelina. Esse tipo de estudo pode servir como ponto de partida para novas pesquisas com o objetivo de detalhar a associação entre a obesidade e a carcinogênese colorretal.

II. OBJETIVOS

1. GERAL

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica do número de células de grelina no reto de ratos Wistar.

2. ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da dieta de cafeteria sobre a expressão imuno-histoquímica do número de células de grelina no reto de ratos Wistar.
- Comparar a expressão imuno-histoquímica do número de células de grelina no reto de ratos Wistar nos subgrupos submetidos à dieta de cafeteria durante 30 e 60 dias.
- Determinar e comparar o tipo morfológico de célula imunorreativa à grelina existente no reto de ratos Wistar.

III. MÉTODO

1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

É um estudo analítico experimental, do tipo corte transversal, com intervenção em animais, desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em conjunto com o Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC).

2. AMOSTRA

Foram estudados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, adultos, machos, com 60 dias de vida e com peso médio variando entre 250 g e 300 g. Os animais eram originários do biotério central da UFSC e foram alojados em grupos de 3 em gaiolas forradas com maravalha, próprias para o tamanho, número e espécie. Os ratos permaneceram sob-regime de adaptação no laboratório da Toce/UFSC durante um período prévio de 7 dias.

Durante todo o experimento foram submetidos aos níveis de ruído, luz e temperatura ambientes, e definiu-se o ciclo dia e noite com fotoperíodo de 12 horas. (123).

Os animais foram pesados semanalmente no mesmo dia e período e também no pré-operatório imediato, com balança digital Precision PR 1000 (Núcleo Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil, número de série 2421).

A distribuição da amostra foi realizada de maneira aleatória, por sorteio simples, em quatro subgrupos distintos, com identificação e codificação crescente dos animais de R1 a R24 (Figuras 1 e 2).

a) Subgrupo Cafeteria 1 (SGC1)

Formado pelos animais numerados e codificados de 1 a 6, este subgrupo recebeu dieta de cafeteria, ração e água *ad libitum* durante **30 dias**. Após esse período, foram mantidos em jejum de 8 horas, sendo posteriormente anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico. Na sequência, foram submetidos à morte indolor assistida.

b) Subgrupo Ração 1 (SGR1)

Formado pelos animais numerados e codificados de 7 a 12, este subgrupo recebeu dieta balanceada (ração específica para a espécie) e água *ad libitum* durante **30 dias**. Após esse período, foram mantidos em jejum de 8 horas, sendo posteriormente anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico. Na sequência, foram submetidos à morte indolor assistida.

c) Subgrupo Cafeteria 2 (SGC2)

Formado pelos animais numerados e codificados de 13 a 18, este subgrupo recebeu dieta de cafeteria, ração e água *ad libitum* durante **60 dias**. Após esse período, foram mantidos em jejum de 8 horas, sendo posteriormente anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico. Na sequência, foram submetidos à morte indolor assistida.

d) Subgrupo Ração 2 (SGR2)

Formado pelos animais numerados e codificados de 19 a 24, este subgrupo recebeu dieta balanceada (ração específica para espécie) e água *ad libitum* durante **60 dias**. Após esse período, foram mantidos em jejum de 8 horas, sendo posteriormente anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico. Na sequência, foram submetidos à morte indolor assistida.

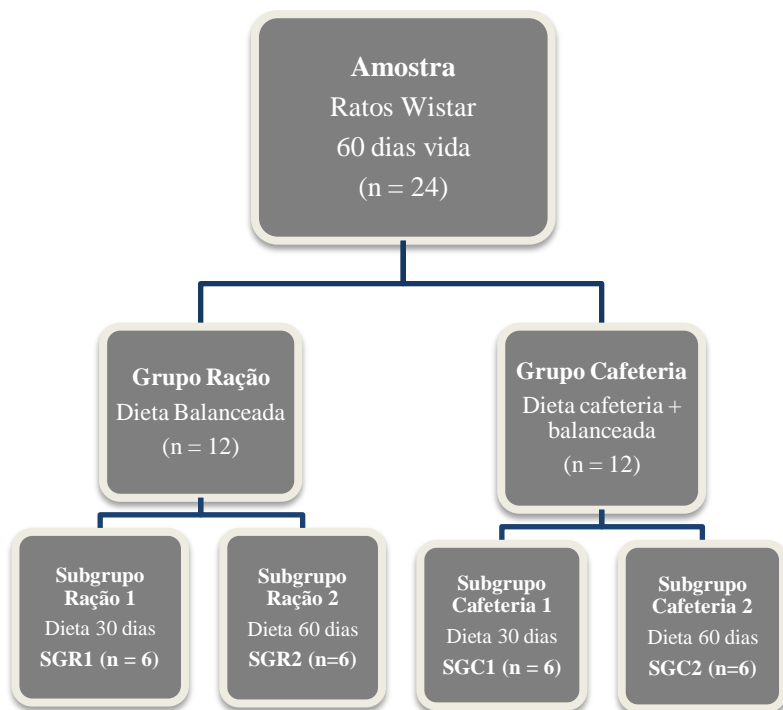


Figura 1- Organograma da divisão da amostra em subgrupos.

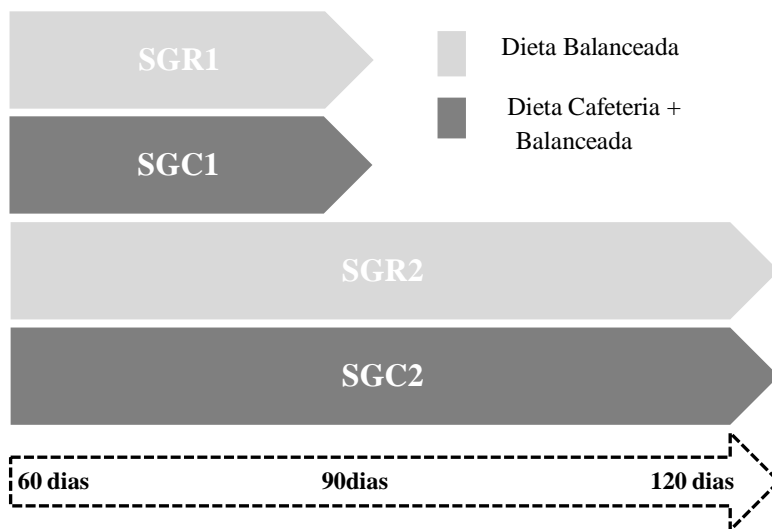


Figura 2- Esquema mostrando o período de alimentação (dias) de cada subgrupo.

3. ASPECTOS ÉTICOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC em 11 de maio de 2011 sob o protocolo PP00591 e processo nº 23080.009228/2011-89. Também obteve aprovação da Direção Geral do HU-UFSC e do Departamento de Cirurgia do HU-UFSC (Anexos A e B).

4. INTERVENÇÕES

4.1 Dieta de Cafeteria

Trata-se de uma dieta hipercalórica, altamente palatável e indutora de obesidade exógena administrada *ad libitum* juntamente com água e ração específica para a espécie, nos subgrupos denominados Cafeteria. Sua composição obedeceu à proporção de 45% de carboidratos, 45% de lipídeos e 10% de proteínas. São exemplos:

- a) alimentos sólidos: chocolates, balas de leite, biscoitos recheados, pão, *bacon* cru, salame, presunto cozido, queijo, amendoim não torrado.
- b) líquidos: refrigerantes.

4.2 Dieta Balanceada (Ração)

A ração utilizada foi Nuvilab Cr-1®, específica para ratos e camundongos, composta de proteína bruta entre 22% e 22,5%, lipídeos entre 4,4% e 4,6%, e carboidratos de 53% a 55%, administrada *ad libitum* para todos os subgrupos.

4.3. Procedimento Anestésico

No pré-anestésico foi administrada, por via subcutânea, em cada animal, uma dose de atropina equivalente a 0,05 mg/kg de peso com o objetivo de minimizar efeito colateral (sialorreia) das drogas anestésicas(123).

A indução e a manutenção anestésicas foram realizadas com solução de quetamina 75 mg/kg associada à xilazina 10 mg/kg, administrada por via intramuscular na face interna de uma das patas traseiras(123).

O efeito anestésico foi avaliado pela ausência de reflexo corneopalpebral e de reação motora após preensão do coxim adiposo de uma pata dianteira, com pinça.

Após a confirmação da indução anestésica, os animais foram identificados e pesados na balança digital Precision PR 1000 (Núcleo Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil, número de série 2421).

4.4. Procedimento Cirúrgico (Amputação do Reto)

- 1º. Depois de anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros torácicos e pelvianos fixados em extensão. Realizou-se tricotomia abdominal e antisepsia local com solução de iodopovidona tópica a 10%.
- 2º. Realizou-se incisão mediana inferiormente, com 4 cm de extensão, direcionada para o ânus, passando lateralmente ao orifício prepucial(124).

- 3°. Foi feita a introdução via retal de cateter de oxigênio nº 8 (CPL Medical's Ltda., São Paulo, Brasil), previamente marcado em 3 cm de comprimento, para identificação e delimitação do nível de secção superior do reto (Figuras 3 e 4).
- 4°. Procedeu-se à dissecação dos órgãos e músculos pélvicos, com secção da sínfise púbica e identificação do reto na pelve com a sonda no interior de sua luz(124) (Figura 5).
- 5°. Foi realizada dissecação pélvica do reto em direção ao ânus, tendo como nível inferior da amputação a margem anal e como nível superior a extremidade do cateter endoluminal previamente introduzido por via retal(124) (Figura 6).
- 6°. Fez-se a marcação da parede anterior do reto com fio mononylon 3.0 (Ethicon, São Paulo, Brasil).
- 7°. Fechou-se a cavidade abdominal com fio mononylon 2.0 (Ethicon, São Paulo, Brasil).
- 8°. Induziu-se a morte indolor assistida dos animais.
- 9°. Realizou-se a pesagem do segmento retal ressecado em balança digital de alta precisão Precison PR 1000 (Núcleo Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil, número de série 2421)
- 10°. Foi feito o acondicionamento das peças em frascos com formalina a 10% tamponada (pH 7,2), que receberam a mesma codificação dos animais de origem.



Figura 3- Marcação da sonda retal



Figura 4- Cateterização retal com a sonda



Figura 5- Dissecção pélvica e isolamento do reto



Figura 6- Reto amputado

4.5. Morte Indolor Assistida

Utilizou-se para a execução da morte indolor assistida a solução de quetamina 300 mg/kg associada à xilasina 30 mg/kg, administrada por via intramuscular. A indicação da morte foi realizada pela constatação de ausência de batimentos cardíacos, movimentos respiratórios e reflexos, sendo confirmada por sangria antes da inutilização dos cadáveres(123).

5. Preparação para o Estudo Imuno-histoquímico

5.1. Etapas da Preparação Macroscópica e Processamento Histológico

Os 24 segmentos retais amputados e codificados foram enviados para o SAP do HU/UFSC e avaliados ao final da preparação técnica por dois médicos patologistas experientes, independentes, que desconheciam a qual subgrupo pertenciam as peças.

Na primeira etapa da preparação macroscópica realizou-se tatuagem da camada serosa do órgão com tinta nanquim, com o objetivo de identificar os segmentos distal (azul) e proximal (verde) da peça (Figuras 7 e 8).



Figura 7- Desenho esquemático da tatuagem do reto (verde= proximal / azul= distal)



Figura 8- Reto amputado tatuado com nanquim

Após a tatuagem, as peças foram posicionadas no sentido craniocaudal e submetidas a um corte longitudinal na parede anterior com 2 mm de espessura para o processamento histológico realizado em aparelho histotécnico (Lupetec, modelo PT09, São Paulo, Brasil, número de série 090056) (Figura 9).

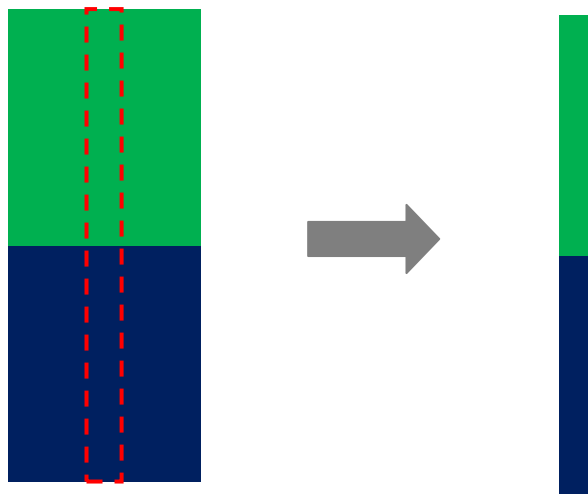


Figura 9- Desenho esquemático demonstrando o corte longitudinal realizado na parede retal anterior para emblocamento

Na sequência, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e numerados de 1 a 24, de acordo com a codificação enviada pelo pesquisador. Depois, congelados e submetidos a cortes microscópicos com espessura de $2\ \mu\text{m}$ em micrótomo rotativo semiautomático (Jung Multicult, Leica, modelo 2040, Alemanha, número de série 01081119) (Figura 10).



Figura 10. Corte do reto tatuado e emblocado em parafina

A partir desses cortes microscópicos foram confeccionadas uma lâmina não silanizada (HDA , nº 7105, Huida, China), para coloração de hematoxilina-eosina (HE), e três lâminas silanizadas (HDA, nº HDAS003, Huida, China) para análise imuno-histoquímica.

As lâminas em HE foram confeccionadas com o objetivo de avaliar e definir a adequabilidade do material incluído. Após essa análise, as lâminas silanizadas foram liberadas para realização do método imuno-histoquímico.

5.2. Método Imunohistoquímico de Contagem Celular

A expressão da proteína grelina no reto dos ratos da linhagem Wistar foi avaliada pela técnica imuno-histoquímica com o método estreptoavidina-biotina-peroxidase (*Labelled Streptavidin Biotin – LSAB*)(125). Os cortes foram montados sobre lâminas silanizadas tratadas com *3-Aminopropyl-triethoxy-silane* (HDA, nº HDAS003, Huida, China).

Após a fixação em estufa a 50°C por 1 hora, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol

com concentrações decrescentes. Na sequência realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, para evitar reações inespecíficas falso-positivas, com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 20 minutos. Depois foram lavados com tampão salina-fosfato pH 7,2 (PBS, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e com água destilada. Posteriormente, induziu-se a reativação antigênica em tampão citrato pH 6,0, em banho-maria a 95-98°C durante 40 minutos. Após essas etapas, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, lavadas com tampão PBS e, em seguida, promoveu-se bloqueio de reação inespecífica com a solução comercial Ultra V Block (Thermo Scientific, CA, EUA) por 5 minutos.

O anticorpo monoclonal anti-grelina (Phoenix Pharmaceuticals, CA, EUA), diluído a 1:10.000, foi adicionado aos cortes teciduais, e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a 8°C por 12 horas. Essas lâminas foram, então, lavadas com tampão PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado (Dako, CA, EUA) por 30 minutos. Finda essa etapa, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Dako, CA, EUA) durante 40 minutos.

Posteriormente às lavagens com PBS, as amostras foram submetidas à revelação colorimétrica, com a solução cromógena 3,3'-diaminobenzidina (DAB), conforme recomendação do fabricante (Biocare Medical, CA, EUA). Após a revelação, foi realizada a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem em meio de montagem sintético (Easy-Path, São Paulo, Brasil) (Figura 11).

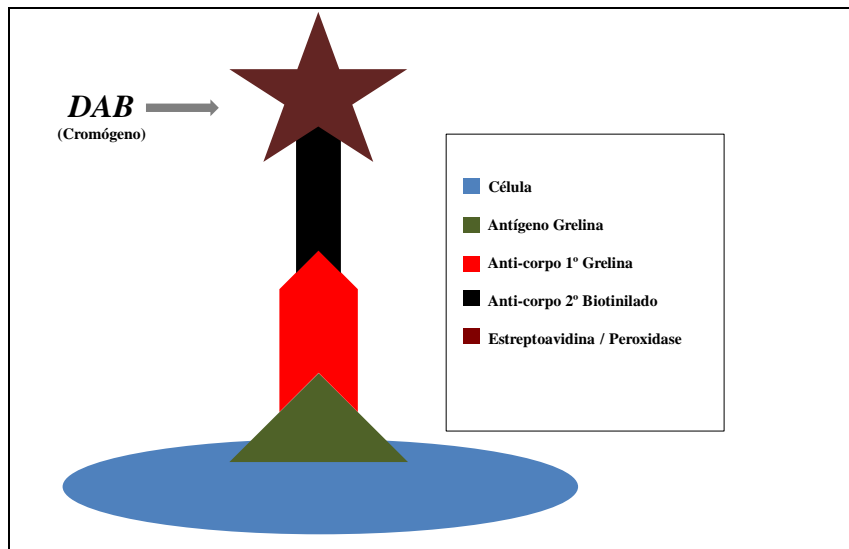


Figura 11- Método imuno-histoquímico estreptoavidina / biotina.

Para o controle positivo, utilizou-se estômago de rato da linhagem Wistar e, para o controle negativo, realizou-se abolição do anticorpo primário nas reações. Foi considerado resultado positivo o aparecimento de células nucleadas, localizadas no epitélio glandular da mucosa do órgão, que expressavam o anticorpo de grelina traduzido pela coloração castanha do citoplasma. Também foi caracterizada a morfometria e a relação das células imunopositivas com o lúmen intestinal.

As lâminas foram analisadas por dois patologistas simultaneamente em microscópio de dupla observação (Nikon, modelo Optiphot-2, Japão, número de série 139447), sendo consideradas células produtoras de grelina somente aquelas em que houve a identificação por ambos os observadores.

Os cortes foram avaliados em toda a sua extensão (3 cm) utilizando-se um aumento de 400x. Contou-se e anotou-se o número absoluto de células que expressavam a grelina de cada lâmina

individualmente, e posteriormente foram transcritos os valores para uma tabela de resultados (Figura 12).

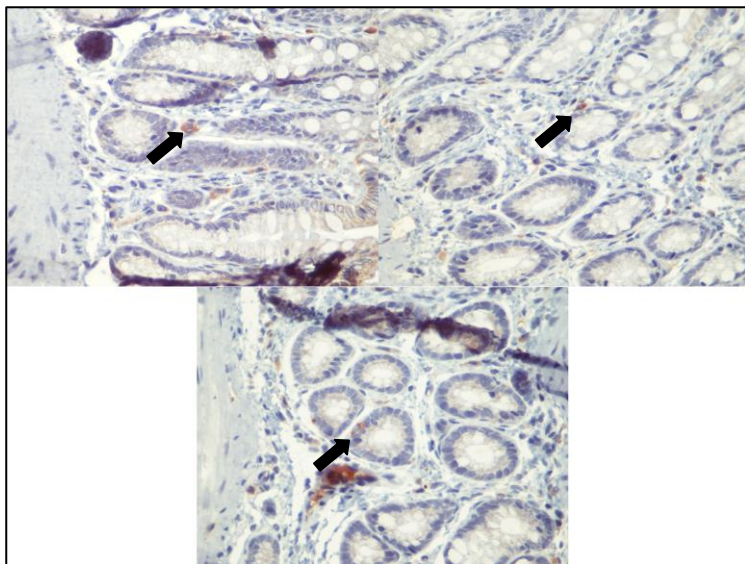


Figura 12. Células imunorreativas à grelina (setas) em lâminas fotografadas pela microscopia óptica com aumento de 400x.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Uma vez que os valores apresentaram uma distribuição normal em cada um dos grupos, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, a comparação das médias dos diferentes subgrupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni. O teste t pareado foi utilizado para comparação das médias do peso no início do acompanhamento e no momento da cirurgia dentro de cada subgrupo. O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar a associação entre a presença de expressão imuno-histoquímica de grelina e o grupo de estudo. Também se utilizou o teste t de Student para comparação das médias de peso do animal e peso retal em relação à presença ou não de expressão de grelina. A análise estatística dos dados foi realizada

utilizando-se o *software* SPSS versão 17.0, e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

IV. RESULTADOS

Variação do peso corporal nos diferentes grupos ao longo das semanas de estudo e peso médio final no dia da cirurgia nos diferentes subgrupos

A evolução do peso corporal dos animais de cada subgrupo ao longo do experimento é demonstrada na Figura 13 (SGC1 e SGR1) e na Figura 14 (SGC2 e SGR2). Quando se comparou o peso médio ao final do acompanhamento (momento da cirurgia) com o peso inicial, foi observado um aumento significativo do peso corporal durante o período do estudo nos animais dos quatro subgrupos ($P = 0,001$).

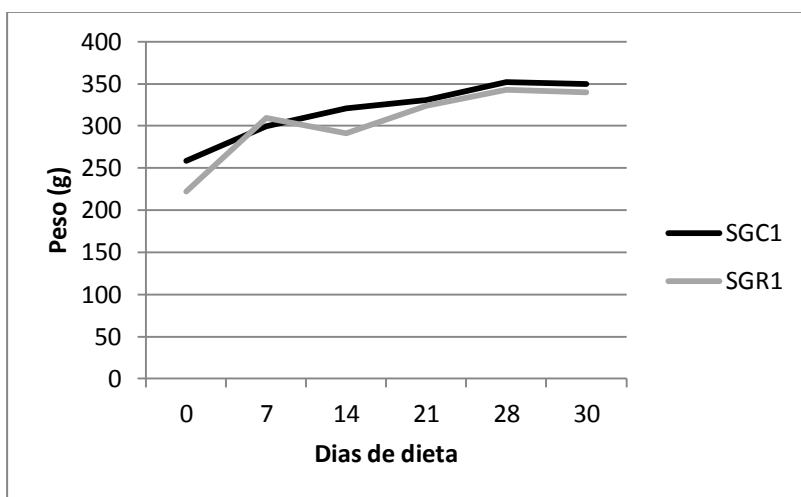


Figura 13- Evolução das médias de peso corporal (gramas) durante o período de dieta, desde o início do estudo até o dia da cirurgia nos subgrupos Cafeteria 1 e Ração 1

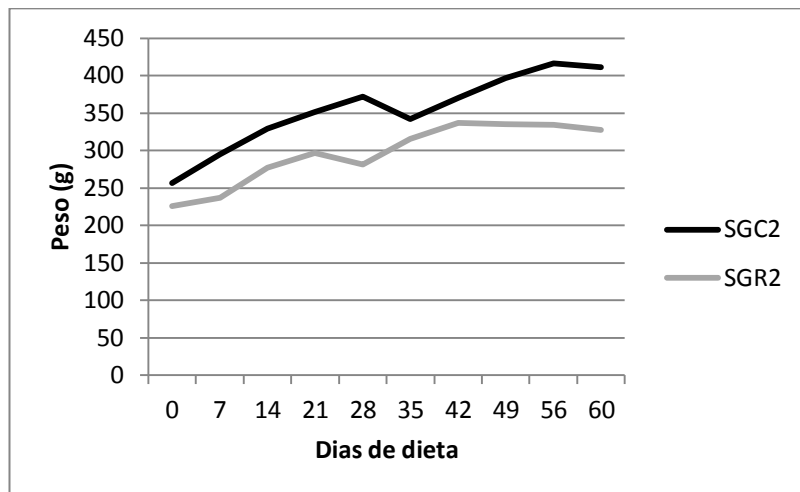


Figura 14- Evolução das médias de peso corporal (gramas) durante o período de dieta, desde o início do estudo até o dia da cirurgia nos subgrupos Cafeteria 2 e Ração 2

A Tabela 1 exibe a média e o desvio padrão (DP) dos pesos de cada subgrupo no dia da cirurgia. Quando comparados quanto ao peso corporal final, os animais do subgrupo SGC2 apresentaram médias significativamente maiores do que aquelas observadas para o subgrupo SGC1 ($P = 0,010$), SGR1 ($P = 0,003$) e SGR2 ($P = 0,001$). Não foram observadas diferenças na comparação do peso corporal entre os demais grupos ($P > 0,05$) (Figura 15).

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) do peso corporal em gramas no dia da cirurgia para os diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2)

Subgrupos	SGC1	SGR1	SGC2	SGR2
Peso final (g)*	349,50	339,83	411,33	327,33
DP*	± 24,40	± 22,44	± 31,61	± 36,84

* Média ± Desvio Padrão

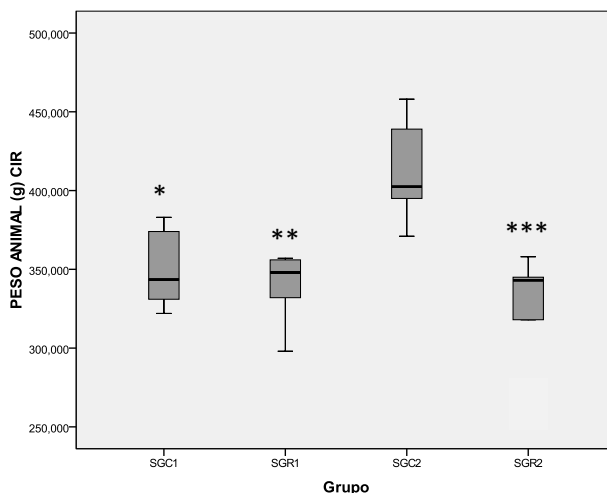


Figura 15- Média de peso corporal em gramas no dia da cirurgia em todos os subgrupos. * $P = 0,010$ na comparação SGC2 x SGC1, ** $P = 0,003$ na comparação SGC2 x SGR1 e *** $P < 0,001$ na comparação SGC2 x SGR2

A variação média de ganho de peso corporal em gramas foi maior nos subgrupos Cafeteria 2 e Ração 2, como demonstrado na Tabela 2, porém não houve diferença estatística quando se compararam os diferentes subgrupos ($P = 0,264$) (Figura 16).

Tabela 2. Variação do ganho de peso corporal em gramas (do início da dieta ao dia da cirurgia) e desvio padrão (DP) dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2)

Subgrupos	SGC1	SGR1	SGC2	SGR2
Ganho peso (g)*	91,17	67,33	154,17	101,00
DP*	± 31,31	± 22,38	± 49,45	± 38,80

* Média ± Desvio Padrão

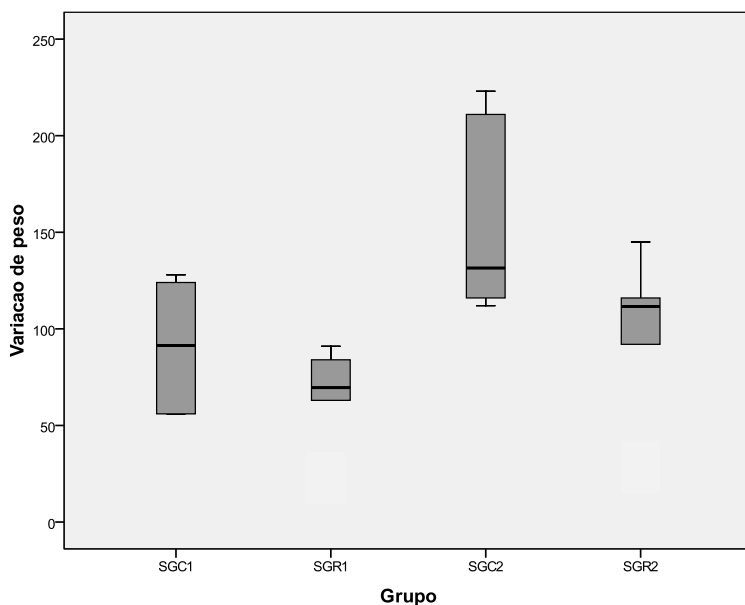


Figura 16- Variação média do ganho de peso corporal em gramas (do início da dieta ao dia da cirurgia) em todos os subgrupos ($P = 0,264$)

Peso retal médio aferido no dia do sacrifício nos diferentes subgrupos

A média do peso retal em gramas dos subgrupos é demonstrada na Tabela 3. Quando comparados quanto ao peso retal, os animais do subgrupo SGC1 apresentaram médias significativamente menores do que aquelas observadas para o subgrupo SGR1 ($P = 0,007$) e SGR2 ($P = 0,001$). De forma semelhante, menor peso retal médio foi observado nos animais do subgrupo SGC2 quando comparados aos do SGR1 ($P = 0,008$) e SGR2 ($P = 0,002$). Não foram observadas diferenças na comparação do peso retal entre os subgrupos SGC1 e SGC2, e entre os subgrupos SGR1 e SGR2 ($P > 0,05$) (Figura 17).

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) do peso retal em gramas dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2)

Subgrupos	SGC1	SGR1	SGC2	SGR2
Peso retal (g)*	0,28	0,37	0,28	0,39
DP*	± 0,05	± 0,04	± 0,02	± 0,02

* Média ± Desvio Padrão

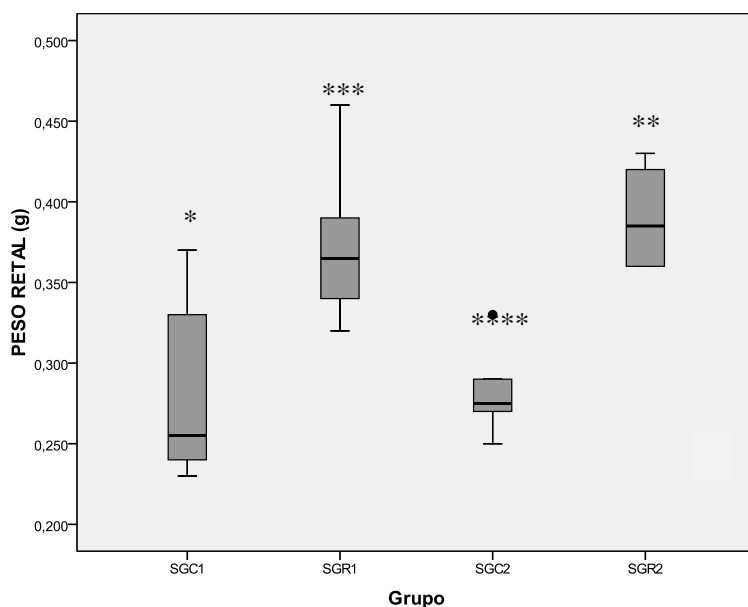


Figura 17. Média do peso retal em gramas (média ± desvio padrão) em todos os subgrupos. Diferenças estatisticamente significantes nas comparações entre os seguintes subgrupos: SGC1 x SGR1 *P=0,007, SGC1 x SGR2 **P = 0,001, SGC2 x SGR1 ***P = 0,008, SGC2 x SGR2 ****P = 0,002

Morfologia das células retais imunorreativas à grelina nos subgrupos estudados

Todas as células identificadas que expressaram o anticorpo de grelina (coloração acastanhada) foram do tipo “fechado” em todos os subgrupos analisados, não sendo encontrada nenhuma célula do tipo “aberto”.

Número de células retais imunorreativas à grelina nos subgrupos estudados

Detalhes sobre a média do número de células retais com expressão de grelina são mostrados na Tabela 4. De uma forma geral, a expressão de grelina foi semelhante, e não foram observadas diferenças na comparação entre os subgrupos ($P = 0,685$).

Tabela 4. Média do número de células retais imunorreativas à grelina e desvio padrão (DP) dos diferentes subgrupos: Cafeteria 1 (SGC1), Ração 1 (SGR1), Cafeteria 2 (SGC2) e Ração 2 (SGR2)

Subgrupos	SGC1	SGR1	SGC2	SGR2
Nº células*	1,67	1,17	0,83	1,00
DP*	± 1,03	± 1,16	± 1,16	± 1,54

* Média ± Desvio Padrão / $P = 0,685$

Quando os subgrupos foram comparados com a relação à presença ou não de expressão da grelina retal, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P = 0,330$). De forma semelhante, o peso corporal do animal no momento da cirurgia e o peso retal foram semelhantes quando aqueles com expressão de grelina foram comparados aos demais ($P = 0,993$ e $P = 0,230$ respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão (DP) do peso do animal na cirurgia e do peso retal em gramas comparados à expressão ou não de células de grelina

Expressão Células Grelina	Sim	Não	P
Peso animal (g)*	356,93 ± 27,10	357,10 ± 60,40	0,993
Peso retal (g)*	0,32 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,230

* Média ± Desvio Padrão

V. DISCUSSÃO

Ainda que seja um grupo de doenças com características em comum, o processo de carcinogênese dos diferentes tipos de neoplasias parece ser multifatorial. Na atualidade, especificamente em relação ao câncer colônico e retal, os hábitos alimentares e o ganho de peso (obesidade) secundário a eles são apontados como um dos principais fatores contribuintes para o aumento da incidência mundial dessa afecção(24).

Com a descoberta do hormônio orexígeno grelina em 1999(25), abriu-se um novo campo de pesquisas em diversas áreas devido a suas inúmeras funções e efeitos. Entre esses efeitos, destaca-se um potencial envolvimento no processo de oncogênese, com evidências da participação desse hormônio na promoção e no desenvolvimento de alguns tipos de tumores, inclusive os colorretais(28).

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a dieta de cafeteria (indutora de obesidade) exerce influência na expressão imuno-histoquímica das células de grelina no reto de cobaias, na tentativa de identificar uma conexão entre esse fator e um possível aumento hormonal local. Uma eventual associação entre a dieta e a imunoexpressão de grelina retal poderia fundamentar pesquisas subsequentes com o intuito de relacionar o aparecimento do câncer de reto à expressão dessa substância, visto que, atualmente, existem poucas pesquisas focando essa questão, e as publicações existentes demonstram resultados conflitantes.

Após o término dos programas alimentares, as médias de peso corporal no dia da cirurgia foram significativamente maiores em todos os subgrupos ($P = 0,001$) quando comparadas às médias de peso inicial. Já na comparação do peso final entre os subgrupos, apenas o SGC2 apresentou peso significativamente maior quando comparado aos subgrupos SGR1 ($P = 0,003$), SGC1 ($P = 0,010$) e SGR2 ($P = 0,001$).

Recentemente, Sampey et al. compararam alterações metabólicas como resistência periférica a insulina, hiperglicemia, esteatose hepática, ganho de peso, inflamação, aumento do tecido adiposo marrom e branco em ratos Wistar machos submetidos durante 15 semanas a diferentes regimes dietéticos: cafeteria, hiperlipídico e *standart*(118). Em todos os

aspectos a dieta de cafeteria mostrou-se o método mais eficaz na reprodução da síndrome metabólica humana e nas tendências da obesidade moderna quando comparada às outras. Foi demonstrado também que ratos alimentados com dieta de cafeteria por um período de 2 semanas já apresentam aumento significativo do peso corporal, dos níveis lipídios séricos e, principalmente, da adiposidade visceral quando comparados a ratos alimentados com dieta *standart* pelo mesmo período, devido principalmente ao aumento da expressão de fatores adipogênicos de transcrição, em especial dos receptores proliferadores ativados dos peroxissomas como o PPAR - γ 2(121).

Alterações no peso corporal e nos níveis séricos de grelina acetilada, entre outros, também foram significativamente maiores em ratos submetidos a regime de dieta de cafeteria durante 5 semanas quando comparados a controles(117), reforçando a hipótese de que períodos curtos sob o regime de cafeteria já são capazes de simular estados semelhantes aos de humanos obesos que desenvolvem neoplasias retais.

Contraditoriamente, dois estudos atuais envolvendo ratos Wistar necessitaram de um programa com 12 semanas de dieta de cafeteria para alcançar diferença significativa na comparação do índice de massa corporal entre os subgrupos ($P < 0,01$), aventando a hipótese de que seja necessário um maior espaço de tempo para o ganho ponderal ser significativo nesses animais(69, 126).

Com base nos dados conflitantes acima citados, adotamos em nosso estudo dois períodos sob o regime de dieta de cafeteria para comparação, SGC1 (30 dias) e SGC2 (60 dias). Acreditamos serem períodos bastantes para que já ocorram alterações metabólicas locais e sistêmicas suficientes para simular os estados inflamatórios, lipídicos e hormonais (grelina) que encontramos em pacientes humanos obesos e portadores de neoplasias retais.

Em nosso estudo, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre o peso final nos subgrupos expostos a 30 dias de dieta (SGC1 e SGR1) pode ser explicada principalmente pelo período de alimentação, que talvez não tenha sido suficiente para proporcionar uma

diferença maior no ganho de peso, apesar do maior aporte calórico oferecido ao SGC1, contrariando parte da literatura estudada.

Certamente, a principal comparação deva ser feita entre os subgrupos de mesma idade e tempo de dieta para evitar possíveis vieses comparativos, ou seja, SGC1 x SGR1 e SGC2 x SGR2. Em relação aos subgrupos com 30 dias de dieta, mesmo não havendo diferença estatística no peso final, acreditamos que as alterações metabólicas estejam presentes no SGC1, como demonstra a literatura estudada, porém não podemos afirmar isso categoricamente, pois não houve mudança significativa no peso corporal entre eles, o que seria um dos fatores que se alteram sob este tipo de regime.

Já entre os subgrupos submetidos a 60 dias de dieta, podemos levar em consideração o ganho de peso e as possíveis alterações na expressão imuno-histoquímica da grelina para comparação entre eles, pois, se houve acúmulo de tecido adiposo (aumento de peso), provavelmente as alterações esperadas em nível tecidual citadas anteriormente também ocorreram.

A variação de peso corporal por si só poderia ser uma variável importante, porém, apesar de ter sido maior nos animais submetidos a 60 dias de dieta, ela não teve significância estatística quando comparados os diferentes subgrupos ($P = 0,264$).

Outro dado avaliado foi a média do peso retal de cada subgrupo e nesse aspecto os resultados não foram semelhantes aos da literatura, pois os subgrupos alimentados com ração obtiveram médias de peso maiores em relação àqueles alimentados com dieta de cafeteria em ambos os períodos. Já foram constatadas diferenças na resposta fisiológica e de ganho de peso em diferentes órgãos como fígado, pulmões, baço, rins, suprarrenais e testículos em ratos alimentados com aportes proteicos (caseína) distintos durante 21 dias, mostrando, inclusive, diminuição da razão do peso do órgão em relação ao peso corporal total no caso do baço(127). Até o presente momento não há relatos na literatura associando a dieta de cafeteria e a medição do peso retal especificamente. Uma única publicação que relaciona essa dieta e a alteração do peso tecidual demonstrou que ratos alimentados sob esse regime têm o peso das células adiposas da medula e do tecido adiposo

marrom interescapular aumentados em quatro e duas vezes respectivamente, quando comparados aos controles(128). Por outro lado, já está estabelecido e demonstrado em humanos e ratos que o tecido muscular possui alta densidade e participa com um maior percentual na soma do peso corporal total quando comparado a tecidos com baixa atividade metabólica, como é o caso do tecido adiposo(129-130). Essa diferença é potencializada em estados em que há pouco consumo energético (obesidade) e em que ocorre a substituição da massa muscular pela gordura, motivo este que acreditamos ser o responsável pelo maior peso retal nos ratos alimentados com ração, já que todos os segmentos retais foram amputados pelo mesmo pesquisador e seguindo a mesma padronização técnica.

Esse aumento de tecido adiposo que gera maior produção de adipocinas localmente pode explicar os achados de Waseem et al., que observaram maior expressão de grelina e seus receptores (principalmente os do tipo GHS-R 1b) em amostras de tecido neoplásico colorretal de pacientes com sobrepeso e obesos quando comparados a tecidos colorretais normais, sugerindo uma participação dessa substância no eixo do desenvolvimento desse tipo de neoplasia(28), o que deve ser objeto de estudo em pesquisas futuras.

As células endócrinas gastrointestinais consistem em dois tipos básicos: as do tipo “fechado”, sem conexão com o lúmen intestinal; e as do tipo “aberto”, em contato com o lúmen. Em nossa análise imuno-histoquímica todas as células imunorreativas à grelina encontradas no reto foram do tipo “fechado”. Já foi confirmado por métodos imuno-histoquímicos a presença de células de grelina em todo o trato gastrointestinal, sendo o estômago o local com maior densidade dessas células. Nele elas são menores e arredondadas, e nos demais segmentos elas têm forma triangular e são mais alongadas, porém sem diferenças imunorreativas(65-66). É sabido também que a porcentagem de células “fechadas” vai diminuindo à medida que se progride distalmente em direção ao cólon, onde predominam, então, as do tipo “aberto”. Uma análise morfométrica nesse mesmo estudo revelou uma densidade (células/mm²) de 10 a 100 vezes maior no corpo gástrico em relação ao trato gastrointestinal baixo(65). Sakata et al. demonstraram essa

mudança após avaliação imuno-histoquímica seriada do estômago, duodeno, íleo, ceco e cólon de ratos Wistar, porém não realizou naquela oportunidade avaliação retal(65).

O método imuno-histoquímico utilizado neste estudo foi o do complexo avidina-biotina-peroxidase, que é o mesmo dos trabalhos já publicados. Com ele apenas a forma acetilada da grelina é avaliada, determinando-se somente a distribuição da grelina ativa nos tecidos. Apesar de Sakata et al. terem demonstrado em seu estudo que 60% das células imunorreativas à grelina no íleo e cólon sejam do tipo “aberto”, nem eles, nem qualquer outro estudo na literatura até o momento avaliou esse aspecto no reto. Portanto, foi a primeira vez que se demonstrou por imunohistoquímica, aqui, não haver esse tipo morfológico no segmento retal.

Já foram definidos pela literatura os fatores que influem na estimulação e na inibição da produção de grelina pelos diversos tecidos periféricos e centrais. Entre eles, a alimentação e a fome são os principais. Estados de jejum absoluto promovem aumento de concentrações plasmáticas de grelina, enquanto seus níveis caem logo após a alimentação. Também há diferenças nos níveis basais de grelina quando comparados indivíduos magros e obesos, sendo esses níveis menores nos últimos(53, 59-60).

A expressão imuno-histoquímica tissular de grelina em alguns órgãos de ratos Wistar também é influenciada pelo estado metabólico e pela dieta, como demonstraram Sahin et al. em dois recentes estudos experimentais(69, 126). Neles os animais foram randomizados em dois grupos com diferentes tipos de dieta (cafeteria e ração) e, ao término de 12 semanas, vários órgãos como estômago, rins, pulmões, traqueia, baço, cérebro, coração, intestinos, entre outros, foram submetidos a análise imuno-histoquímica e de radioimunoensaio. Na grande maioria das comparações, houve diminuição na concentração e expressão da grelina no grupo alimentado com dieta indutora de obesidade, porém com significância especificamente no esôfago, duodeno, jejuno, pâncreas, paratireoides, coração, timo, útero, testículos, próstata e vesículas seminais.

Em nosso estudo, a imunoexpressão de grelina retal nos diferentes subgrupos foi baixa, como esperado e de acordo com a literatura, e não apresentou diferença estatística quando comparada à média do número de células imunorreatoras ($P = 0,685$), nem a ausência ou presença de expressão de grelina ($P = 0,330$). A média de peso do animal na cirurgia e o peso retal também não apresentaram significância estatística em relação à expressão ou não de grelina ($P = 0,993$ e $P = 0,230$ respectivamente). Esses achados corroboram os publicados por Sahin et al., que também não encontraram diferenças significativas em relação ao cólon e ao reto. Talvez no reto o aumento ponderal e a dieta não exerçam tanta influência sobre o eixo de produção e expressão de grelina, sendo necessárias novas pesquisas específicas para determinar tal relação.

Entre as diferenças metodológicas com o estudo de Sahin et al. destacamos: maior período de dieta utilizado por ele, o que provavelmente influenciou, mas não foi determinante nos resultados imuno-histoquímicos, e apenas teve repercussão no ganho de peso corporal, pois no presente estudo houve diferença significativa apenas entre os subgrupos SGR1 e SGC2; número de animais alocados, que em nossa pesquisa foi duas vezes maior ($n=24$) contra 12 ratos do trabalho de Sahin et al., de forma a ter alcançado, em nossa visão, uma representatividade mais forte; e, por fim, a forma empregada na contagem ou mensuração da expressão imuno-histoquímica de grelina, que foi feita por meio de intensidade de expressão e dividida em graus de 0 a +3 por Sahin et al., o que proporcionou em nossa opinião, resultados de caráter subjetivo e examinador-dependente, diferentemente da forma utilizada em nosso estudo, em que, além da identificação e classificação em expressão ou não- expressão, utilizou-se a contagem total do número de células imunorreatoras com as respectivas médias entre os subgrupos, fator este que, em nossa opinião, proporciona melhor confiabilidade e reprodutibilidade para fins de análise estatística em comparações futuras. Além das questões metodológicas citadas, é provável que a baixa expressão de grelina retal encontrada em ambos os estudos, tenha dificultado a observação de associações com a dieta e o peso dos animais.

Pesquisas recentes em humanos revelam que tecidos neoplásicos colorretais expressam a grelina e seus receptores com maior intensidade quando comparados a tecidos colorretais saudáveis, sendo associados à maior progressão tumoral(28). Contraditoriamente, pacientes caquéticos portadores de câncer gástrico ou colorretal têm níveis plasmáticos desse hormônio diminuídos(102). Além disso, existem poucos trabalhos publicados que avaliam o papel da dieta indutora de obesidade sobre o eixo de produção da grelina nesses órgãos, o que, acreditamos, se tratar de um possível elo para explicar o desenvolvimento dos tumores.

Entre as limitações desta pesquisa, podemos citar como principais: a não utilização do índice de massa corporal (IMC) como variável de comparação entre os subgrupos, que é calculado pela medição da altura da ponta do nariz até o ânus em centímetros e pelo peso em gramas onde se divide o peso pela altura ao quadrado e obtém-se o valor de IMC em g/cm^2 , apesar de existir uma variação na literatura quanto às unidades utilizadas para esse cálculo, o que poderia facilitar a discussão com os estudos já publicados, além de se adequar a conceitos de obesidade e sobrepeso já utilizados em humanos; e a falta de análise plasmática da grelina e de perfis lipídicos, que serviriam como parâmetros e elementos comprobatórios das alterações metabólicas sistêmicas induzidas pela dieta. Ainda assim, o caráter inédito do estudo em relação ao tempo de dieta, idade dos animais e análise morfológica celular retal pode servir como ponto de partida para futuras pesquisas em que se avalie o papel da obesidade e da grelina na oncogênese desse órgão.

VI. CONCLUSÕES

- A dieta de cafeteria não influenciou no número de células retais imunorreativas à grelina na comparação com o grupo controle.
- Não houve diferença no número de células retais imunorreativas à grelina quando comparados os períodos de dieta (30 e 60 dias).
- A morfologia das células retais imunorreativas à grelina identificadas foi apenas do tipo “fechado”.

VII. REFERÊNCIAS

1. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA*. 2012 Feb 1;307(5):483-90.
2. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA*. 2002 Oct 9;288(14):1728-32.
3. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*. 2002 Oct 9;288(14):1723-7.
4. Howel D. Trends in the Prevalence of Abdominal Obesity and Overweight in English Adults (1993-2008). *Obesity* (Silver Spring). 2011 May 19.
5. Moura EC, Claro RM. Estimates of obesity trends in Brazil, 2006-2009. *Int J Public Health*. 2012 Feb;57(1):127-33.
6. Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jun;75(6):971-7.
7. WorldHealthOrganization. Obesity and Overweight. Geneva - Switzerland 2012 [updated March 2011; cited April 24, 2012]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.
8. Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010 Mar;39(1):1-7.
9. Ogden CL, Carroll MD, McDowell MA, Flegal KM. Obesity among adults in the United States--no statistically significant change since 2003-2004. *NCHS Data Brief*. 2007 Nov(1):1-8.
10. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012 Feb 1;307(5):491-7.
11. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8:200.
12. Ruesten A, Steffen A, Floegel A, A DL, Masala G, Tjonneland A, et al. Trend in obesity prevalence in European adult cohort populations during follow-up since 1996 and their predictions to 2015. *PLoS One*. 2011;6(11):e27455.
13. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Is obesity replacing or adding to undernutrition? Evidence from different social classes in Brazil. *Public Health Nutr*. 2002 Feb;5(1A):105-12.

14. Gigante DP, Moura EC, Sardinha LM. Prevalence of overweight and obesity and associated factors, Brazil, 2006. *Rev Saude Publica*. 2009 Nov;43 Suppl 2:83-9.
15. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
16. Tarabra E, Actis GC, Fadda M, De Paolis P, Comandone A, Coda R, et al. The obesity gene and colorectal cancer risk: a population study in Northern Italy. *Eur J Intern Med*. 2012 Jan;23(1):65-9.
17. Terry PD, Miller AB, Rohan TE. Obesity and colorectal cancer risk in women. *Gut*. 2002 Aug;51(2):191-4.
18. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Dec;16(12):2533-47.
19. Le Marchand L, Wilkens LR, Mi MP. Obesity in youth and middle age and risk of colorectal cancer in men. *Cancer Causes Control*. 1992 Jul;3(4):349-54.
20. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Jul 15;26(2):161-81.
21. AmericanCancerSociety. Colon and Rectal Cancer. 2012 [updated 03/02/2011; cited 2012 April 24]; Available from: www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/.
22. InstitutoNacionaldoCâncer. Estimativa 2012. Rio de Janeiro2012 [updated 2011; cited 2012 Abril 24]; Available from: www.inca.gov.br/estimativa/2012.
23. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007 Sep;86(3):556-65.
24. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol*. 2007 Aug 21;13(31):4199-206.
25. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
26. Freeman HJ. Risk of gastrointestinal malignancies and mechanisms of cancer development with obesity and its treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Dec;18(6):1167-75.
27. Wang Z, Wang W, Qiu W, Fan Y, Zhao J, Wang Y, et al. Involvement of ghrelin-growth hormone secretagogue receptor system

in pathoclinical profiles of digestive system cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007 Dec;39(12):992-8.

28. Waseem T, Javaid Ur R, Ahmad F, Azam M, Qureshi MA. Role of ghrelin axis in colorectal cancer: a novel association. *Peptides*. 2008 Aug;29(8):1369-76.

29. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):495-522.

30. Argetsinger LS, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev*. 1996 Oct;76(4):1089-107.

31. Mulchahey JJ, Di Blasio AM, Jaffe RB. Effects of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on GH secretion from individual human and monkey fetal anterior pituitary cells: modulation by thyroid hormones and glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Feb;66(2):395-401.

32. Tannenbaum GS, Ling N. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*. 1984 Nov;115(5):1952-7.

33. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*. 1984 May;114(5):1537-45.

34. Bowers CY. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci*. 1998 Dec;54(12):1316-29.

35. Dickson SL, Bailey AR, Leng G. Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion. *Growth Horm IGF Res*. 1999 Apr;9 Suppl A:89-91.

36. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996 Aug 16;273(5277):974-7.

37. Smith RG, Feighner S, Prendergast K, Guan X, Howard A. A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release. *Trends Endocrinol Metab*. 1999 May;10(4):128-35.

38. Ben-Shlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Mar;21(3):123-33.

39. Bennett PA, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology*. 1997 Nov;138(11):4552-7.

40. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Aug;48(1):23-9.
41. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4255-61.
42. Rindi G, Necchi V, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, et al. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*. 2002 Jun;117(6):511-9.
43. Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept*. 2001 Jun 15;99(2-3):141-50.
44. Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol*. 2002 May;173(2):239-45.
45. Sakata I, Tanaka T, Matsubara M, Yamazaki M, Tani S, Hayashi Y, et al. Postnatal changes in ghrelin mRNA expression and in ghrelin-producing cells in the rat stomach. *J Endocrinol*. 2002 Sep;174(3):463-71.
46. Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Kangawa K. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):6-9.
47. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):21995-2000.
48. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):64-70.
49. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):387-96.

50. Al Massadi O, Tschop MH, Tong J. Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides*. 2011 Nov;32(11):2301-8.
51. Lim CT, Kola B, Grossman A, Korbonits M. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr J*. 2011;58(8):707-10.
52. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 29;279(3):909-13.
53. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1714-9.
54. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol*. 2002 Nov;175(2):R7-11.
55. Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M, et al. Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res*. 2003 Jan-Feb;37(1):17-22.
56. Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, et al. Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. 2003 Oct;28(7):829-35.
57. Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Lainchbury JG, Rademaker MT, Nicholls MG, et al. Urocortin-1 infusion in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Mar;89(3):1402-9.
58. Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1-3):101-7.
59. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):240-4.
60. Rubino F, Gagner M. Weight loss and plasma ghrelin levels. *N Engl J Med*. 2002 Oct 24;347(17):1379-81; author reply -81.
61. Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jun;286(6):E963-7.
62. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct;86(10):4753-8.

63. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2988.
64. Yabuki A, Ojima T, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Matsumoto M, et al. Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. *J Anat.* 2004 Sep;205(3):239-46.
65. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides.* 2002 Mar;23(3):531-6.
66. Sakata I, Sakai T. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept.* 2010 Mar;2010:1-7.
67. Teive MB, Russi RF, Vieira DS, Teive AM, Costa A, d'Acampora AJ. Quantitative immunohistochemical analysis of duodenal ghrelin cells after sleeve gastrectomy in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2012 Sep;27(9):595-9.
68. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes.* 2002 Jan;51(1):124-9.
69. Sahin I, Aydin S, Ozkan Y, Dagli AF, Akin KO, Guzel SP, et al. Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol Cell Biochem.* 2011 Sep;355(1-2):299-308.
70. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):194-8.
71. Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, et al. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett.* 2002 Mar 22;321(3):157-60.
72. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 26;280(3):904-7.
73. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1120-8.
74. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in

healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 May;280(5):R1483-7.

75. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5854-9.

76. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct;86(10):5083-6.

77. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol*. 2002 Jul;14(7):555-60.

78. Wang Y, Nishi M, Doi A, Shono T, Furukawa Y, Shimada T, et al. Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. *FEBS Lett*. 2010 Apr 16;584(8):1503-8.

79. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Oct 5;276(3):905-8.

80. Yakabi K, Kawashima J, Kato S. Ghrelin and gastric acid secretion. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov 7;14(41):6334-8.

81. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res*. 2005 May;20(5):790-8.

82. Bellone S, Prodham F, Savastio S, De Rienzo F, Demarchi I, Trovato L, et al. Acylated and unacylated ghrelin levels in normal weight and obese children: Influence of puberty and relationship with insulin, leptin and adiponectin levels. *J Endocrinol Invest*. 2012 Feb;35(2):191-7.

83. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4284-91.

84. Otero M, Nogueiras R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Mar;43(3):306-10.

85. Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008 Oct;21(5):774-9.

86. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery*. 2008 Mar;143(3):334-42.
87. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1707-20.
88. Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML, et al. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology*. 2010 Mar;51(3):974-85.
89. Yokote R, Sato M, Matsubara S, Ohye H, Niimi M, Murao K, et al. Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues. *Peptides*. 1998;19(1):15-20.
90. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Apr;14(2):113-22.
91. Fung JN, Seim I, Wang D, Obermair A, Chopin LK, Chen C. Expression and in vitro functions of the ghrelin axis in endometrial cancer. *Horm Cancer*. 2010 Oct;1(5):245-55.
92. Chopin L, Walpole C, Seim I, Cunningham P, Murray R, Whiteside E, et al. Ghrelin and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jun 20;340(1):65-9.
93. Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK. Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activates mitogen-activated protein kinase in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8295-303.
94. Jeffery PL, Murray RE, Yeh AH, McNamara JF, Duncan RP, Francis GD, et al. Expression and function of the ghrelin axis, including a novel preproghrelin isoform, in human breast cancer tissues and cell lines. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Dec;12(4):839-50.
95. Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Marrocco T, Deghenghi R, Ghigo E, et al. The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. *Endocrinology*. 2002 Feb;143(2):484-91.
96. Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol*. 2003 Feb;162(2):645-54.

97. Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghe C, Ghigo E, Muccioli G, et al. Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J Endocrinol Invest.* 2006 Oct;29(9):781-90.
98. Dixit VD, Weeraratna AT, Yang H, Bertak D, Cooper-Jenkins A, Riggins GJ, et al. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor constitute a novel autocrine pathway in astrocytoma motility. *J Biol Chem.* 2006 Jun 16;281(24):16681-90.
99. Duxbury MS, Waseem T, Ito H, Robinson MK, Zinner MJ, Ashley SW, et al. Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 19;309(2):464-8.
100. Diaz-Lezama N, Hernandez-Elvira M, Sandoval A, Monroy A, Felix R, Monjaraz E. Ghrelin inhibits proliferation and increases T-type Ca^{2+} channel expression in PC-3 human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Dec 3;403(1):24-9.
101. He XT, Fan XM, Zha XL. Ghrelin inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colonic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jul;26(7):1169-73.
102. Huang Q, Fan YZ, Ge BJ, Zhu Q, Tu ZY. Circulating ghrelin in patients with gastric or colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2007 Mar;52(3):803-9.
103. D'Onghia V, Leoncini R, Carli R, Santoro A, Giglioni S, Sorbellini F, et al. Circulating gastrin and ghrelin levels in patients with colorectal cancer: correlation with tumour stage, *Helicobacter pylori* infection and BMI. *Biomed Pharmacother.* 2007 Feb-Apr;61(2-3):137-41.
104. Medrado-Faria MA, Rodrigues de Almeida JW, Zanetta DM. Gastric and colorectal cancer mortality in an urban and industrialized area of Brazil. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2001 Mar-Apr;56(2):47-52.
105. IARC. Weight Control and Physical Activity. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Lyon - France: IARC Press; 2002. p. 85-95.
106. Steinbach G, Kumar SP, Reddy BS, Lipkin M, Holt PR. Effects of caloric restriction and dietary fat on epithelial cell proliferation in rat colon. *Cancer Res.* 1993 Jun 15;53(12):2745-9.
107. Laake I, Thune I, Selmer R, Tretli S, Slattey ML, Veierod MB. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of cancer in the proximal and distal colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Jun;19(6):1511-22.

108. Matsuo K, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Sugawara Y, Sasazuki S, et al. Association between body mass index and the colorectal cancer risk in Japan: pooled analysis of population-based cohort studies in Japan. *Annals of Oncology*. 2012 Feb;23(2):479-90.
109. Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006 Mar;17(3):145-56.
110. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Preliminary communication: glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women: a prospective analysis from the European prospective investigation into cancer-Norfolk study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Jun;13(6):915-9.
111. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr*. 2001 Nov;131(11 Suppl):3109S-20S.
112. Tran TT, Medline A, Bruce WR. Insulin promotion of colon tumors in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Dec;5(12):1013-5.
113. Das A, Mukhopadhyay S. The evil axis of obesity, inflammation and type-2 diabetes. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011 Mar;11(1):23-31.
114. Gonzalez-Chavez A, Elizondo-Argueta S, Gutierrez-Reyes G, Leon-Pedroza JI. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir Cir*. 2011 Mar-Apr;79(2):209-16.
115. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 May;280(5):E745-51.
116. Heyne A, Kiesselbach C, Sahun I, McDonald J, Gaiffi M, Dierssen M, et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict Biol*. 2009 Sep;14(4):373-83.
117. Colombo G, Bazzo ML, Nogueira CL, Colombo MD, Schiavon LL, d'Acampora AJ. A study on the short-term effect of cafeteria diet and pioglitazone on insulin resistance and serum levels of adiponectin and ghrelin. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Oct;45(10):935-41.
118. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Feb 17.

119. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Lima-Leopoldo AP, Campos DH, Leopoldo AS, et al. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit.* 2010 Dec;16(12):BR367-73.
120. Castell-Auvi A, Cedo L, Pallares V, Blay M, Ardevol A, Pinent M. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. *Br J Nutr.* 2011 Dec 12:1-8.
121. Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A. PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res.* 2004 Sep;12(9):1455-63.
122. Aydin S, Sahin I, Ozkan Y, Dag E, Gunay A, Guzel SP, et al. Examination of the tissue ghrelin expression of rats with diet-induced obesity using radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Mol Cell Biochem.* 2012 Feb 18.
123. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. FIOCRUZ, editor. Salvador- BA: FIOCRUZ; 2005.
124. Walker Jr W F, Homberger D G. *Anatomy & Dissection of the Rat.* 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company 1997. p. 44-8.
125. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981 Jun;75(6):816-21.
126. Sahin I, Aydin S, Ozkan Y, Dagli AF, Akin KO, Guzel SP, et al. Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol Cell Biochem.* 2011 May 10.
127. Schweisthal MR, Cole TB, Jr., Mercer LP. The ability to predict weight gain, individual organ weight, and corresponding food intake in the rat by the four-parameter model for physiological responses. *Anat Rec.* 1982 Jan;202(1):131-6.
128. Gianotti M, Roca P, Palou A. Body weight and tissue composition in rats made obese by a cafeteria diet. Effect of 24 hours starvation. *Horm Metab Res.* 1988 Apr;20(4):208-12.
129. Even PC, Rolland V, Roseau S, Bouthegourd JC, Tome D. Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age, and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Jun;280(6):R1887-96.
130. Gallagher D, Belmonte D, Deurenberg P, Wang Z, Krasnow N, Pi-Sunyer FX, et al. Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass. *Am J Physiol.* 1998 Aug;275(2 Pt 1):E249-58.

ANEXO A – PROTOCOLO APROVADO PELO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA HU-UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Florianópolis, 28 de janeiro de 2011.

De: Dr. Humberto Fenner Lyra Júnior

Para: Dr. Ricardo Baratieri - Chefe do Departamento de Cirurgia

Assunto: Aprovação de execução de projeto de pesquisa científica

Solicito aprovação de projeto e permissão para realização do mesmo junto ao laboratório de Técnica Operatória da UFSC. O trabalho tem como orientador o Prof. Armando José d'Acamora e será intitulado: **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS RETAIS PRODUTORAS DE GRELINA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA** Este estudo faz parte do Programa de Mestrado em Ciências Médicas HU/UFSC.

Ad referendum
Parte
28/01/2011

Prof. Ricardo Baratieri
Chefe do Departamento de Cirurgia
CLC/CCS/UFSC
Portaria nº 471/09

Humberto Fenner Lyra Júnior
Mestrando

ANEXO B – PROTOCOLO APROVADO PELA CEUA – UFSC**Protocolo**

PP00591

Título

DETERMINAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA GRELINA NO RETO DE RATOS WISTAR

Data de Entrada

22/02/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

06/05/2011

Considerações

Ofício nº 64/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Armando José d'Acampora, Departamento de Cirurgia - CCS

Prezado(a) Professor(a).

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de vinte e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).
- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.
- Processo cadastrado sob o número: 23080.009228/2011-89

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 11/08/2013

Data 11/05/2011

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**